

Aus dem Institut für Zellbiologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. V. Herzog

**ENDOCYTOSE IN SCHILDDRÜSENFOLLIKELZELLEN
NACH SELEKTIVER MARKIERUNG DER
APIKALEN PLASMAMEMBRAN MIT LEKTINEN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Susanne Chrestel
aus
Kronstadt

1986

Aus dem Institut für Zellbiologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. V. Herzog

**ENDOCYTOSE IN SCHILDDRÜSENFOLLIKELZELLEN
NACH SELEKTIVER MARKIERUNG DER
APIKALEN PLASMAMEMBRAN MIT LEKTINEN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Susanne Chrestel
aus
Kronstadt

1986

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Berichterstatter: Prof. Dr. V. Herzog /

Mitberichterstatter: Prof. Dr. O.-A. Müller

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.1986

Danksagungen

Herrn Professor Dr. V. Herzog möchte ich dafür danken, daß er durch seine hervorragende Einweisung in die Methoden der Zellbiologie und Elektronenmikroskopie sowie durch die vielen hilfreichen Diskussionen das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht hat. Ich möchte ihm dafür danken, daß er nicht nur ein guter Doktorvater war, sondern darüber hinaus auch ein Lehrer, der mir während meines Studiums mit guten Ratschlägen immer hilfreich zur Seite stand.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie danke ich herzlich für ihre freundliche Aufnahme und für ihre Hilfe.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

	Seite
<u>1. EINLEITUNG</u>	1
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	4
2.1 <u>Material</u>	4
2.1.1 Gewebe	4
2.1.2 Medien für Follikelisolation und Suspensionskulturen	4
2.1.3 Materialien für die Follikelpräparation	5
2.1.4 Materialien für Cytochemie	5
2.1.5 Materialien zur Fixation und Einbettung für die Elektronenmikroskopie	7
2.2 <u>Methoden</u>	18
2.2.1 Herstellung von Lektin-Gold- und Lektin-Ferritin-Konjugaten und ihre Anwendung als spezifische Glykocalyxmarker	18
a) Präparation von kolloidalem Gold	18
b) Präparation von Lektin-Gold-Konjugaten	18
c) Präparation von Lektin-Ferritin-Konjugaten	18
2.2.2 Verwendung von Cationisiertem Ferritin (CF) als unspezifischen Membranmarker in Endocytose-Studien	19
2.2.3 Präparation von inside-out Follikeln aus Schweineschilddrüsen	20
a) Isolation von Follikelsegmenten aus Schweineschilddrüsen	20
b) Herstellung von Suspensionskulturen	21
2.2.4 Durchführung der Experimente	25
a) Direkte Markierung der apikalen Plasmamembran mit WGA-Ferritin- und WGA-Gold-Konjugaten (Ein-Schritt-Methode)	25
b) Indirekte Markierung der apikalen Plasmamembran, Drei-Schritt-Markierung unter Verwendung des Avidin-Biotin-Systems	27
c) Endocytoseversuch	32
d) Sequentielle Doppelmarkierung von inside-out Follikelzellen	34
2.2.5 Präparation der Follikel für die Elektronenmikroskopie	36

	Seite
2.3 <u>Anhang: Kritische Anmerkungen zur Verwendung von Lektin-Gold- und Lektin-Ferritin-Konjugaten als Membranmarker</u>	37
2.3.1 Eigenschaften von Lektinen und ihre Anwendung zur Untersuchung von Kohlenhydratkomponenten von Zelloberflächen	38
2.3.2 Eigenschaften von Lektin-Ferritin und Lektin-Gold-Konjugaten	41
 3. <u>ERGEBNISSE</u>	 47
3.1 <u>Selektive Markierung der apikalen Plasmamembran von inside-out Follikeln</u>	47
3.2 <u>Auswahl eines Lektins als Glykocalyxmarker für die apikale Plasmamembran von Schilddrüsenfollikelzellen</u>	50
3.3 <u>Morphometrische Bestimmung der Markierungsdichte nach Markierung der apikalen Plasmamembran mit spezifischen Glykocalyxmarkern (Vergleich von drei Markierungsmethoden)</u>	54
3.4 <u>Endocytose von WGA-Ferritin und WGA-Gold-Konjugaten</u>	59
3.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	59
3.4.2 Qualitative Beschreibung der Kinetik der Endocytose	62
3.4.3 Morphologie der während der Endocytose von WGA-Gold und WGA-Ferritin markierten Kompartimente	65
a) Kompartimente der früheren Phase (0 - 5 min)	65
b) Kompartimente der intermediären Phase (5 - 30 min)	65
c) Kompartimente der späten Phase (30 min - 10 h)	65
3.5 <u>Sequentielle Doppelmarkierung mit WGA-Gold und cationisiertem Ferritin</u>	74
3.5.1 Vormarkierung von inside-out Follikeln mit kolloidalem Gold	74
3.5.2 Endocytose von cationisiertem Ferritin	74
3.5.3 Endocytose von WGA-Gold und Endocytose von cationisiertem Ferritin	76
Unterschiede und Gemeinsamkeiten	
3.5.4 Morphologie von sekundären Lysosomen bei sequentieller Doppelmarkierung von inside-out Follikeln	78

	Seite
<u>4. DISKUSSION</u>	81
4.1 <u>Die lysosomale Route in inside-out Follikelzellen</u>	81
4.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	81
4.1.2 Bindung von WGA an die apikale Plasmamembran und Endocytose	83
4.1.3 Das prälysosomale Kompartiment	87
4.1.4 Lysosomen	92
4.2 <u>Membran-Recycling in Schilddrüsenfollikelzellen</u>	98
4.2.1 Das Konzept des Membran-Recycling	98
4.2.2 Membran-Recycling in Schilddrüsenfollikelzellen	99
4.2.3 Membran-Recycling in anderen Zellsystemen	102
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	104
<u>6. LITERATURVERZEICHNIS</u>	106

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°	
Å	Angström
BNHS	Biotinyl-N-Hydroxy-Succinimide
CF	cationisiertes Ferritin
Con A	Concanavalin A
cp	coated pit
cv	coated vesicle
DMF	Dimethylfluoramide
EGF	Epidermal Growth Factor
ES	Endosom
Fe	Eisen
FKS	fetales Kälberserum
IgG	Immunoglobulin G
I.P.	isoelektrischer Punkt
KH	Kohlenhydrat
Lys	Lysosom
LDL	low density lipoprotein
MEM	Eagle's minimum essential medium
mU	Milli-units
MVB	Multivesicular body (Multivesikuläres Körperchen)
MW	Molekulargewicht
PAH	Phythämagglutinin
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PM	Plasmamembran
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TG	Thyreoglobulin
TSH	Thyroid stimulating hormone (Schilddrüsen-stimulierendes Hormon, Thyreotropes Hormon)
V	Volumen
WGA	Wheat germ agglutinin (Weizenkeim-Lektin)

1. EINLEITUNG

Thyreoglobulin (MW 670.000) ist der makromolekulare Vorläufer der Schilddrüsenhormone (Wollman 1969).

Die Sekretion von Schilddrüsenhormonen erfordert einen komplexen, bidirektionalen Transport von Thyreoglobulin durch die Schilddrüsenzelle: Thyreoglobulin wird nach seiner Synthese glykosyliert (120), phosphoryliert (75), sulfatiert (54,55) und jodiert (124). In dieser Form wird Thyreoglobulin im Follikellumen gespeichert, bis es durch Endocytose zu Lysosomen transportiert wird. In Lysosomen werden durch partielle Proteolyse von Thyreoglobulin die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) freigesetzt. Endocytose und Transport von Thyreoglobulin zu Lysosomen sind TSH-abhängige Vorgänge.

Aus Untersuchungen mit Gold- und radiomarkiertem Thyreoglobulin (51) ist bekannt, daß Thyreoglobulin durch adsorptive Endocytose an der apikalen Plasmamembran über coated pits in die Zelle aufgenommen wird. Die Natur der Thyreoglobulin-Membran-Interaktion ist noch weitgehend unbekannt. Es wird ein Thyreoglobulin-Rezeptor diskutiert (107,114).

Membranrezeptoren, die eine adsorptive Endocytose von Liganden vermitteln, sind in der Regel glykosyliert (16). Einige der Kohlenhydratmoleküle erlauben eine spezifische Markierung und dadurch Untersuchungen über den Endocytoseweg eines Rezeptors.

Lektine, die spezifisch an bestimmte Zucker oder Zuckerkombinationen binden, sind dafür geeignete Marker.

Ein von Herzog (46,50) entwickeltes System von inside-out Follikel-Suspensionskulturen bietet die Möglichkeit der selektiven Markierung der apikalen Plasmamembran von Schilddrüsenfollikelzellen:

Aus Schweineschilddrüsen isolierte Follikelsegmente schließen sich in Suspensionskultur innerhalb von 24 Stunden zu Follikeln mit einer strukturell und funktionell umgekehrten Polarität. Die "inside-out" Polarität der Follikel ist unter Suspensionsbedingungen stabil: die apikale Plasmamembran ist gegen das Kulturmedium gerichtet, während die basolaterale Plasmamembran das neu gebildete Follikellumen begrenzt. Die apikale Plasmamembran ist durch tight junctions von der basolateralen Plasmamembran getrennt. Tight junctions sind für Makromoleküle nicht passierbar: damit dichtet die apikale Plasmamembran das Follikellumen der inside-out Follikel gegen Diffusion von Makromolekülen aus dem extrafollikulären Raum ab.

Die Markierung der apikalen Plasmamembran von inside-out Follikeln mit an elektronendichte Tracer konjugierten Lektinen und die nachfolgende Endocytose der markierten Membrankomponenten ist die experimentelle Grundlage für die Darstellung des Endocytosewegs von glykosylierten Membrankomponenten in Schilddrüsenfollikelzellen.

Ziele dieser Arbeit waren im einzelnen:

1. Ausarbeitung von elektronenmikroskopisch-cytochemischen Techniken zur Darstellung der Glykocalix der apikalen Plasmamembran.

(Anwendung von verschiedenen Markierungsmethoden, um Einflüsse der Markermoleküle auf das Verhalten der markierten Komponenten und auf die physiologische Zellfunktion zu erfassen.)

2. Darstellung und Charakterisierung der intrazellulären Kompartimente, die sich an der Endocytose von glykosylierten Membrankomponenten beteiligen.

3. Versuch, einige Aspekte der Genese und Morphologie von sekundären Lysosomen in Schilddrüsenfollikelzellen darzustellen. Dazu wurden Endocytoseexperimente mit vormarkierten Follikelzellen durchgeführt.

Medizinische Relevanz

Zahlreiche Schilddrüsenerkrankungen sind sehr wahrscheinlich auf einen fehlerhaften Ablauf des komplizierten intrazellulären Transportes von Thyreoglobulin zurückzuführen.

Kenntnis der zellbiologischen Grundlagen der Endocytose-Mechanismen könnte daher zum Verständnis der Pathogenese eines Teils der Schilddrüsenerkrankungen beitragen.



2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Gewebe

Die Schilddrüsen von 6-8 Monate alten Schweinen (80-90kg) wurden etwa 10 Minuten nach der Schlachtung der Tiere durch Elektroanästhesie und Entbluten entnommen. Die Drüsen hatten ein durchschnittliches Gewicht von 8 g. Sie wurden auf Eis gekühlt innerhalb von 20 Minuten ins Labor gebracht und hier sofort weiterverarbeitet.

2.1.2 Medien für Follikelisolation und Suspensionskulturen

a) Zusätze für Medien

Eagle's Minimum Essential Medium (MEM): Boehringer Mannheim GmbH; Nr. 209996 (Mannheim, B.R.D.)

Fetales Kälberserum: Gibco Biokult (Glasgow, Schottland) Nr. 629 HJ

Streptomycin-Penicillin: Boehringer Mannheim; Nr. 210404

Amphotericin B: Fungizone Squibb; Flow Lab (Bonn) Nr. 16.723.46

Collagenase (aus Clostridium histolyticum: 125 units/mg): Boehringer Mannheim; Nr. 103586

Trypsin Inhibitor (aus Soyabohnen): Sigma Chemie München; Nr. T-9003

TSH (aus Rinderhypophysen): Sigma Chemie München; Nr. TS-10 oder Fleming Arzneimittel GmbH, Kiel

b) Zusammensetzung der Medien

Medium 1 (Waschen): Eagle's Minimum Essential Medium
+ 1 mg/ml Glucose
+ 0.1 mg/ml Trypsin Inhibitor

Medium 2 (enzymatische Behandlung):
Eagle's Minimum Essential Medium
+ 1 mg/ml Glucose
+ 1 mg/ml Collagenase

Medium 3 (steriles Waschen):
Eagle's Minimum Essential Medium
+ 1 mg/ml Glucose
+ Penicillin 100 IU/ml
+ Streptomycin 100 ug/ml
+ Amphotericin B 0.5 ug/ml

Medium 4 (für Suspensionskultur): wie Medium 3
+ fetales Kälberserum FKS (End-
konzentration von FKS: 10%)

Die Medien 3 und 4 wurden vor Gebrauch steril filtriert.

2.1.3 Materialien für die Follikelpräparation

Nybolt Filter: Schweizerische Seidengaze-Fabrik,
Zürich, Schweiz

Kulturschalen mit hydrphobem Boden für Suspensions-
kultur (Petriperm); W.C. Heraeus GmbH, Hanau

Millipore Filter

2.1.4 Materialien für Cytochemie

Lektine: alle von Sigma Chemical Company;
P.O.Box 14 568 St. Louis, MO 63 178, USA

- 1) Wheat Germ Agglutinin from *Triticum Vulgaris*
(Weizenkeimlektin MW 18.000; Zuckerspezifität:
N-Acetyl-D-Glucosamin)
Lot No 71-F-9640
- 2) *Arachis hypogaea* from Peanut
(Erdnußlektin MW 108.000; Zuckerspezifität:
D(+)-Galaktose)
Lot No 41-T-9500
- 3) Glycine Max from Soybean
(Soyabohnenlektin MW 120.000; Zuckerspezifität:
N-Acetyl-D-Galaktosamin und D(+)-Galaktose)
Lot No 118-C-9650 1
- 4) *Limulus Polyphemus* from Horse Shoe Crab
(Krabbenlektin MW 400.000; Zuckerspezifität:
N-Acetyl-Neuraminsäure; D-Glucuronsäure)
Lot No 101-T-3927
- 5) Asparagus pea from Lotus Tetragonolobus
(Spargelbohnenlektin MW 120.000;
Zuckerspezifität: α -L-Fukose)
Lot No 117-C-9560 1
- 6) Concanavalin A from *Canavalia ensiformis*
(Jakob-Bohnen-Lektin MW 55.000;
Zuckerspezifität: α -D-Mannose)

Cationisiertes Ferritin (CF) mit einem isoelektrischen
Punkt von pH 8.5; Miles Laboratories Inc.
(Research Products Division; Elhart)

Natives Ferritin (aus Pferdemiß; Cadmium-frei);
Miles Laboratories Inc. #96-028 (100 mg/ml)

Glutaraldehyd 70%: Ladd Research Industries Inc;
(Burlington, Vermont; USA)

Tetrachlorgold (HAuCl_4): Merck AG; Darmstadt; No 1582

Weißer Phosphor: Sigma Chemie (München)

Diäthyläther: Sigma Chemie (München)

Polyäthylenglykol: PEG (Corbowax) Merck AG; Darmstadt

Kaliumcarbonat (K_2CO_3): Sigma Chemie (München)

Streptavidin: Sigma Chemical Company; P.O.Box 14568
St. Louis, MO 63 178, USA

Biotinyl-N-hydroxysuccinimide BNHS: Sigma Chemie
(München)

Dimethylfluoramid DMF: Sigma Chemie (München)

2.1.5 Materialien zur Fixation und Einbettung für die Elektronenmikroskopie

Karnovsky's Fixative (Karnovsky 1965): 3% Gluturaldehyd
mit 1% Formaldehyd in 0.1 M Cacodylat Puffer

Cacodylat Puffer 0.1 und 0.2 M; pH 7.2

Phosphatgepufferte Physiologische Kochsalzlösung (PBS):

8.1 g NaCl
0.862 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
0.248 g KH_2PO_4
in 1000 ml H_2O bei pH 7.2

Äthanol: Merck AG, Darmstadt

Propylenoxid: Merck AG, Darmstadt

Epon nach Luft: (Epon 812)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Lektin-Gold- und Lektin-Ferritin-Konjugaten und ihre Anwendung als spezifische Glykocalixmarker in der Elektronenmikroskopie

Prinzip der elektronenmikroskopisch-cytochemischen Technik

Die Konjugation von Lektinen mit elektronendichten Tracermolekülen wie z.B. Ferritin oder kolloidalem Gold ermöglicht die elektronenmikroskopische Darstellung der Verteilung von Lektinbindungsstellen auf Zelloberflächen (103). (siehe Abb. 1)

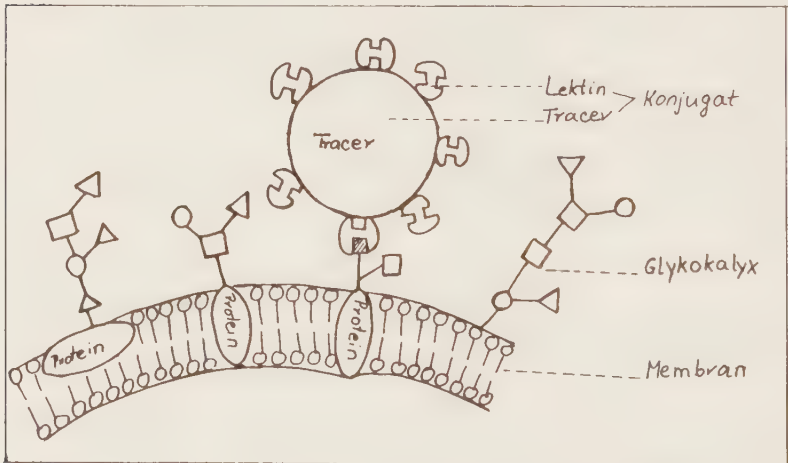


Abb. 1 Prinzip der elektronenmikroskopisch-cytochemischen Markierungsmethode (modif. nach Sharon 1977)

Glykolipide und Glykoproteine sind Bestandteile der Zellmembran. Der Kohlenhydratanteil besteht aus verzweigten Oligomeren. Das Kohlenhydratmuster verleiht der Zelloberfläche charakteristische Eigenschaften.

Lektine binden spezifisch an bestimmte Zucker oder Zuckerkombinationen der Zelloberfläche. Werden Lektine mit elektronendichten Tracern wie z.B. Ferritin oder kolloidalem Gold konjugiert, können die Lektinbindungsstellen auf Zelloberflächen elektronenmikroskopisch dargestellt werden.

Zur Darstellung der Kohlenhydratkomponenten der apikalen Plasmamembran von Schilddrüsenfollikelzellen wurden in der vorliegenden Arbeit WGA-Gold- und WGA-Ferritin-Konjugate als Marker verwendet. WGA ist ein aus Weizenkeim isoliertes Lektin, das spezifisch an N-Acetylglukosamin bindet.

Die Konjugate wurden selbst hergestellt, weil sie käuflichen Präparationen überlegen sind. Die bessere Qualität von selbst hergestellten Lektin-Gold-Präparationen (d.h. die höhere Effizienz der Lektin-Gold-Kopplung) konnte mit Hilfe eines colorimetrischen Tests (66) nachgewiesen werden.

a) Präparation von kolloidalem Gold

Kolloidale Goldlösungen wurden durch Reduktion von Goldtetrachlorid, HAuCl_4 , hergestellt. Die Größe der Goldpartikel kann durch Stärke und Konzentration des verwendeten Reduktionsmittels (z.B. weißer Phosphor, Na^+ -Citrat oder Na^+ -Ascorbat) variiert werden (106). Die in dieser Arbeit verwendeten Goldpartikel hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 5 nm ($5,2 \pm 2,5$) = 50 Å. Sie wurden durch Reduktion von HAuCl_4 mit weißem Phosphor nach der Methode von Faulk und Taylor (28) modifiziert nach Romano (92) hergestellt:

1,5 ml einer 1% HAuCl_4 Lösung und 1,4 ml einer 0,2 M K_2CO_3 -Lösung wurden mit 120 ml doppelt destilliertem Wasser in einem silikonisierten Erlenmeyer-Kolben gut vermischt. Zu dieser Lösung wurde 1 ml einer Lösung von weißem Phosphor in Diäthyläther unter ständigem Rühren zugegeben. Die Äther-Phosphorlösung bestand aus 4 Teilen Diäthyläther und 1 Teil phosphorgesättigtem Äther.

Die mit weißem Phosphor versetzte HAuCl_4 Lösung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit verfärbte sich die anfangs farblose Lösung bräunlich-violett.

Die Lösung wurde unter langsamem Erwärmen (unter Reflux) zum Kochen gebracht. Die Reaktion war nach ungefähr 5 Minuten Kochzeit beendet, wenn die Farbe von bräunlich-violett nach purpurrot umschlug. Die dunkelrote Farbe zeigt das Vorliegen einer kolloidalen Goldlösung an.

Einstellung des pH-Wertes von kolloidalen Goldlösungen

Die Einstellung des pH-Wertes von kolloidalen Goldlösungen erfolgte nach Abkühlung durch Zugabe von 0,2 M K_2CO_3 (um die Lösung basisch zu machen) beziehungsweise von 1 M H_3PO_4 oder 1 M Essigsäure (um die Lösung sauer zu machen). (31)

Kolloidale Goldlösungen sind für pH-Elektroden schädlich, weil präzipitierte Goldpartikel am Glas der Elektroden haften bleiben. Um eine Präzipitation des kolloidalen Goldes durch das KCl der Elektrode zu verhindern, muß vor pH-Messungen Polyethylenglykol (PEG) zur Stabilisierung der Goldlösung zugegeben werden. Zu 10 ml Goldlösung wurden 2 Tropfen einer 1% PEG (MW 20.000) - Lösung zugegeben.

b) Präparation von Protein-Gold-Konjugaten

Prinzip:

Von einigen Ausnahmen abgesehen, lassen sich Proteine (z.B. IgG, Protein A, Thyreoglobulin oder Lektine) sehr gut mit Goldpartikeln verschiedener Größe konjugieren und als elektronendichte Marker benutzen.

Die biologische Aktivität der an Goldpartikel adsorbier-ten Proteine bleibt erhalten (59,93,95).

Die Natur der Protein-Gold-Bindung ist noch nicht genau aufgeklärt: es handelt sich um eine nicht-kova-lente, irreversible Bindung, die wahrscheinlich unter anderem auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht (29). Die Stabilisierung von kolloidalem Gold durch ein Protein ist abhängig:

1. von der Ionenkonzentration des Reaktionsgemisches
2. von dem isoelektrischen Punkt (I.P.) des Proteins (und damit vom pH-Wert der Lösung)
3. von der Konzentration des Proteins.

Um optimale Bedingungen für die Adsorption eines Proteins an kolloidales Gold zu ermitteln, muß für jedes Protein eine pH-Isotherme und eine Konzentrations-Isotherme aufgestellt werden:

Assay zur Ermittlung der Konzentrations-Isotherme

Die optimale Proteinmenge, die zur Stabilisierung von kolloidalen Goldpartikeln durch Adsorption von Protein erforderlich ist (die sog. Sättigungskonzen-tration), wurde nach Horrisberger ermittelt (59,62):

1. Der pH-Wert der kolloidalen Goldlösung (50 Å⁰-Goldpartikel) wurde auf den isoelektrischen Punkt des zu koppelnden Proteins eingestellt.
2. Zu jeweils 4 ml Goldlösung wurden jeweils 1 ml Proteinlösung steigender Konzentration (1 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml; 500 µg/ml; 1 mg/ml; 2 mg/ml) unter ständigem Rühren (Magnet-rührer) zugegeben.

3. Die mit Protein versetzten Goldlösungen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden jeweils 0,5 ml einer 10% NaCl-Lösung zugegeben. In Ansätzen mit einer niedrigen Proteinkonzentration fand spontan oder nach Zugabe von NaCl ein Farbumschlag von rot nach violett statt, der die Präzipitation des kolloidalen Goldes anzeigte.

Die niedrigste Proteinkonzentration, die eine Präzipitation der Goldlösung verhindern konnte, wurde als Sättigungskonzentration angenommen.

Zur Herstellung von Protein-Gold-Konjugaten wird im allgemeinen ein 10-20%iger Proteinüberschuß verwendet (106). Die zu adsorbierenden Proteine wurden in doppelt destilliertem Wasser gelöst und vor Gebrauch durch Millipore-Filter (0,45 μ m Porengröße) filtriert.

Assay zur Ermittlung der pH-Isotherme

Der optimale pH-Wert wurde durch Aufstellung einer pH-Isotherme nach Geoghegan (31) ermittelt:

1. Es wurden 12 Ansätze mit jeweils 4 ml Goldlösung mit steigenden pH-Werten (pH: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5) vorbereitet.
2. Zu jedem Ansatz wurde Protein (in aqua bidest. gelöst) zugegeben. Die Proteinkonzentration lag 20-30% höher als die ermittelte Sättigungskonzentration.
3. Die Lösungen wurden 30 Minuten unter Rühren (Magnetrührer) inkubiert und danach mit jeweils 0,5 ml einer 10%igen NaCl-Lösung versetzt.

Nach 30 Minuten wurde das Ergebnis abgelesen:

- in Ansätzen, deren pH-Wert niedriger war als der isoelektrische Punkt des Proteins, fand sofort nach Zugabe des Proteins eine Präzipitation der Goldlösung statt.
- in Ansätzen mit einem oberhalb des I.P. des Proteins liegenden pH-Wertes fand eine Präzipitation nach Zugabe von NaCl-Lösung statt.
- Ansätze, deren pH-Wert dem I.P. des Proteins entsprachen beziehungsweise leicht oberhalb davon lagen, blieben nach Protein- und NaCl-Zugabe stabil.

Daraus wurde gefolgert, daß die Protein-Gold-Konjugation bei einem pH-Wert im Bereich des I.P. des Proteins durchgeführt werden sollte.

Stabilisierung von kolloidalen Gold-Protein-Konjugaten mit PEG

Selbst nach Konjugation mit Proteinen neigen kolloidale Goldlösungen unter bestimmten Bedingungen (z.B. bei hoher Salzkonzentration) zur Präzipitation (61).

Um ein erhöhtes Maß an Stabilität zu erreichen, wurde nach erfolgter Protein-Gold Kopplung Polyethylen-Glykol (PEG, Carbowax 20, Fluka) als Stabilisator zugegeben. PEG ist ein ungeladenes Makromolekül mit einem MW von 20.000. Die stabilisierende Wirkung beruht auf Oberflächenphänomenen zwischen dem ungeladenen PEG-Molekül und den Goldpartikeln. Die optimale, zur Stabilisierung erforderliche Konzentration von PEG ist abhängig von der Größe der Goldpartikel: Für 50 Å Goldpartikel sind 3,2 mg PEG/100 ml Goldlösung erforderlich (61).

Kopplung von WGA an 50 Å-Goldpartikel

Physikalisch-chemische Eigenschaften von WGA:

WGA ist ein aus Weizenkeim isoliertes Lektin mit einem MW von 18.000. Es besteht aus zwei identischen Untereinheiten und besitzt vier Bindungsstellen für N-Acetyl-D-Glucosamin.

Der isoelektrische Punkt von WGA liegt in einem Bereich von pH 7,9-9,4 (90). Die Kopplung von WGA an 50 Å-Goldpartikel wurde bei einem pH von 8,5 durchgeführt. Die minimale WGA-Konzentration, die zur Stabilisierung von 50 Å-Goldpartikeln erforderlich war, wurde mit dem Stabilitätstest nach Horrisberger (59,62) ermittelt. Für die Herstellung von WGA-Gold-Konjugaten wurde eine 30% über der ermittelten Sättigungskonzentration liegende WGA-Menge verwendet. Sie betrug 1 mg WGA/4 ml Goldlösung.

Durchführung der WGA-Gold-Kopplung: /

Alle Protein-Gold-Kopplungsreaktionen wurden in Polystyrene-Tubes durchgeführt, um eine Adsorption von Goldpartikeln an Gefäßwände (und damit die Bildung von Aggregationszentren) zu vermeiden. 1 mg WGA wurde in 500 µl doppelt destilliertem Wasser gelöst und durch Millipore (0,45 µm) filtriert. Zu der Proteinlösung wurden unter ständigem Rühren (Magnetrührer) 4 ml einer kolloidalen Goldlösung (Partikelgröße 50 Å; pH 8,5) zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation (unter ständigem Rühren) wurden 100 ml einer 5%igen PEG-Lösung (Carbowax 20, Fluka) zugegeben, um eine maximale Stabilisierung der WGA-Gold-Konjugate zu erreichen.

Zentrifugation: Entfernung von ungebundenen WGA

Die WGA-Gold-Lösung wurde in Polyethylene-Zentrifugenröhrchen übertragen und 45 Minuten bei 125.000 x g (50,1 S Rotor, bei 4°C) zentrifugiert. Der Überstand, der nicht gebundenes WGA enthielt, wurde vorsichtig mit einer Pasteur Pipette abgesaugt und verworfen. Das Pellet setzte sich aus einem dicht gepackten, am Zentrifugenröhrchen haftenden Anteil aus präzipitiertem Gold und einem roten, lockeren Anteil aus WGA-Gold-Partikeln zusammen. Der lockere Anteil des Pellets wurde in 1 ml PGE-haltigem, doppelt destilliertem Wasser resuspendiert und bei 4°C in frischen Polypropylene-Tubes aufbewahrt.

Zur Konservierung kann Na-Azid zugegeben werden. Die Endkonzentration von Na-Azid sollte 0,01% betragen. (Na-Azid muß vor Gebrauch immer frisch angesetzt werden.) Um einen höheren Reinheitsgrad der Goldpräparation zu erreichen, kann ein zweiter Zentrifugationsschritt angeschlossen werden. Goldpartikel einheitlicher Größe kann man erzielen, wenn die Goldpräparation auf 20%ige Succhrose-Lösung überschichtet und zentrifugiert wird (4 Stunden bei 35.000 rpm im SW 28 Rotor bei 4°C). Kleine Goldpartikel bleiben in höheren Schichten der Succhrose-Lösung liegen. Das Sediment besteht aus relativ einheitlichen 50 Å-Partikeln (modifiziert nach 6).

c) Präparation von Lektin-Ferritin-Konjugaten

Prinzip:

Durch kovalente Bindung von Lektin an natives Ferritin erhält man biologisch aktive Konjugate, die die Fähigkeit der Lektine besitzen, spezifisch an Zuckerkomponenten zu binden (78,77,82).

Die Konjugation wurde nach der Gluturaldehyd-Methode von Avrameas (6) in ihrer Modifikation nach Bayer und Skutelsky (9) durchgeführt:

Die Menge des zu konjugierenden Proteins richtete sich nach dem Molekulargewicht. Für Proteine mit einem MW zwischen 15.000 und 80.000 wurden 3 mg Protein für 20 mg = 200 µl natives Ferritin verwendet.

Kopplung von WGA an Ferritin:

Reagentien

WGA (MW 18.000): 5 mg/ml in PBS gelöst

Natives Ferritin (MW 500.000): 100 mg/ml (Cadmium-frei, aus Pferdemicz, Miles Lab.)

Glutaraldehyd 70% (Ladd Comp.); davon wird eine 0,5%ige Lösung durch Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt.

Reaktion:

3 mg WGA wurden in 600 µl PBS gelöst und mit 20 mg nativem Ferritin in 200 µl PBS gut vermischt. Unter ständigem Rühren (Magnetrührer) wurden langsam, innerhalb von 10 Minuten, 88 µl einer 0,5%igen Glutaraldehyd-Lösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 4 Stunden bei Zimmertemperatur (im Dunkeln) unter ständigem Rühren inkubiert.

Über Nacht wurde gegen PBS bei 4°C dialysiert, um überschüssigen Glutaraldehyd zu entfernen.

Trennung der WGA-Ferritin-Konjugate von ungebundenen WGA:

Nach der Dialyse wurde die Lösung mit PBS auf ein Volumen von 12 ml aufgefüllt und in Polyallomer-Tubes (Beckman # 342082) übertragen.

Es erfolgte eine erste Zentrifugation (30 Minuten bei 10.000 x g in der Kühlzentrifuge J-21, Beckman), um große Gluturaldehyd-Protein-Aggregate aus der Lösung zu entfernen. Die Aggregate bildeten ein Pellet. Der Überstand, der Protein-Ferritin-Konjugate und freies WGA enthielt, wurde in Polyallomer-Tubes abgefüllt und einer erneuten Zentrifugation zugeführt. Die zweite Zentrifugation wurde in der Ultrazentrifuge (Beckman) in einem SW 50,1 Rotor bei 100.000 x g = 35.000 rpm, 3 Stunden bei 4°C durchgeführt. Der Überstand enthielt freies Protein (WGA) und wurde verworfen. Das Pellet bestand aus WGA-Ferritin-Konjugaten und freiem Ferritin. Um einen höheren Reinheitsgrad zu erzielen und das gesamte überschüssige WGA zu entfernen, wurde das Pellet 2 x in PBS gewaschen. Dazu wurde die oben beschriebene Zentrifugation in der Ultrazentrifuge 2 x wiederholt. Das endgültige Pellet wurde in 10,5 ml PBS resuspendiert, steril-filtriert (durch Millipore 0,45 µm) und bei 4°C in Netheler-Bechern aufbewahrt (siehe Zusammenfassung Tab. 1).

Reaktion:

1. 3 mg WGA (in 600 μ l PBS) werden mit 20 mg nativem Ferritin (in 200 μ l PBS) gemischt. 88 μ l 0,5% Glutaraldehyd werden langsam, innerhalb von ca. 10 Minuten zugegeben.

2. 4 h bei Raumtemperatur mischen

3. Dialyse über Nacht gegen PBS; (2 x wechseln)

4. Trennung der WGA-Ferritin-Konjugate von unkonjugiertem WGA:

Konjugat (800 μ l) nach Dialyse mit PBS auf 12 ml auffüllen;
Zentrifugation:

- ① WGA-Ferritin; freies Ferritin; unkonjugiertes WGA; Aggregate

30' bei 10.000 x g in der Kühlzentrifuge J-21

Pellet: Glutaraldehyd-WGA-Aggregate
(verwerfen)

- ② Überstand: WGA-Ferritin; freies Ferritin; unkonjugiertes WGA

3 h bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge (SW 50,1 Rotor)

Überstand: unkonjugiertes WGA
(verwerfen)

2x

Pellet: WGA-Ferritin; freies Ferritin

Tabelle 1: Präparation von WGA-Ferritin-Konjugaten; Zusammenfassung

2.2.2 Verwendung von Cationisiertem Ferritin (CF) als unspezifischen Membranmarker in Endocytose-Studien

Cationisiertes Ferritin (CF) ist ein Makromolekül (MW 462.000) mit einem Durchmesser von 110 Å (43). Es besitzt einen elektronendichten Kern (= inner core) von 55 Å Durchmesser. Das im Elektronenmikroskop sichtbare Partikel entspricht dem "inner core".

Neben der natürlichen Elektronendichte hat Ferritin noch folgende Vorteile als Tracer:

- relativ homogene Größe der CF-Partikel
- gute Verträglichkeit von Cadmium-freiem CF für Zellen.

Der wichtigste Nachteil von CF als Endocytosemarker ist die Schwierigkeit, Ferritinpartikel mit genügender Sicherheit gegen die "Background-Granularity" abzugrenzen.

CF bindet an anionische Gruppen der Zelloberfläche. Die meisten negativ geladenen Gruppen werden von Sialylsäureresten gebildet. CF geht mit Sialylsäureresten elektrostatische Wechselwirkungen ein (19, 24, 46, 81, 25, 26, 102, 104). CF bindet nicht ausschließlich an Sialylsäurereste, sondern geht auch mit anderen negativ geladenen Oberflächengruppen Wechselwirkungen ein: es ist ein unspezifischer Membranmarker.

CF wird durch adsorptive Endocytose in die Zelle aufgenommen (47). Bei der Anwendung von CF muß beachtet werden, daß das negativ geladene Ferritin Wechselwirkungen mit positiv geladenen Proteinen (z.B. Serumproteinen) eingeht und Aggregate bildet. Um dieses zu vermeiden, wird die Bindung von CF an Zelloberflächen in PBS oder in einfachen Serum-freien Medien (z.B. Eagle's Medium) durchgeführt. Einige Zellen produzieren sekretorische Proteine (z.B. Thyreoglobulin), die mit CF Aggregate

bilden und die Bindung des Markers an die Zellmembran verhindern: Zellen müssen vor Inkubation mit CF-haltigem Medium 3-4 x in Protein-freiem Medium gewaschen werden (49). CF wird als Membranmarker in Konzentrationen von 1 - 50 µg/ml verwendet.

2.2.3 Präparation von inside-out-Follikeln aus Schweineschilddrüsen

a) Isolation von Follikelsegmenten aus Schweineschilddrüsen

Die Isolation von Follikelsegmenten aus Schweineschilddrüse erfolgte nach der Methode von Herzog (46,48): Die Schilddrüsen wurden von Binde- und Fettgewebe befreit und mit Rasierklingen in würfelförmige Stücke von 1 mm Kantenlänge geschnitten.

Die Gewebestücke wurden 4 x in Eagle's Medium gewaschen und danach 30 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln (Wasserbad mit 60 Bewegungen/min) in Collagenase-Medium (1 mg Collagenase/ml Eagle's Medium) inkubiert. Der pH-Wert der Gewebesuspension wurde durch intermittierende CO₂-Begasung auf pH 7,35 - 7,45 gehalten. Nach 30 Minuten Enzymeinwirkung wurden die Gewebestücke Scherkräften ausgesetzt: sie wurden durch silikonisierte Pasteurpipetten mit abgeflamten Spitzen gezogen. Die Spitzen der Pasteurpipetten hatten unterschiedliche Durchmesser. Der Pipettiervorgang wurde mit Pipetten von 1 mm Durchmesser begonnen und nach 10 Minuten für jeweils weitere 10 - 15 Minuten mit Pipetten mit abnehmenden Durchmessern (800, 700 und 600 µm) fortgesetzt. Nach einer Gesamtpipettierzeit von 60-80 Minuten erhielt man eine Gewebesuspension von Follikelsegmenten, Bindegewebe, Kollagenfasern und unverdauten Gewebestücken.

Um die Follikelsegmente vom restlichen Gewebe abzutrennen, wurde die Suspension zweimal durch Nylon-Gaze (Schweizerische Seidengaze-Fabrik, Zürich, Schweiz) filtriert. Die Maschenweite der Gaze betrug bei der ersten Filtration 250 μm und dann 200 μm . Zwischen den Filtrationen wurde die Suspension 30 sec bei 70 x g zentrifugiert (Labofuge II, Heraeus-Christ, Hanau) und das Pellet in frischem Medium resuspendiert.

Nach der Filtration durch 200 μm Gaze wurde erneut zentrifugiert (30 sec bei 70 x g) und das Pellet in sterilem Eagle's Medium resuspendiert. Der Waschvorgang wurde 5-6 x unter sterilen Bedingungen bei 4°C wiederholt. Dabei wurden Einzelzellen und Membranen zerstörter Zellen weitgehend aus der Follikelsuspension entfernt.

b) Herstellung von Suspensionskulturen

Frisch isolierte, steril gewaschene Follikelsegmente wurden in Kulturmedium (Eagle's Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 100 IU/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin B) resuspendiert und in Kulturschalen mit hydrophoben Böden (Petriperm, hydrphob, Heraeus, Hanau) ausgesät.

Die Anzahl ausgesäter Follikelsegmente entsprach im Durchschnitt einem DNA-Gehalt von 50 μg pro Kulturschale. Das Anlegen der Suspensionskulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow-Abzug-Haube (Prettl, Pfullingen). Die Suspensionskulturen wurden 24 Stunden in einem Bagasungsbrutschrank (B 5060 EC/02 Heraeus, Hanau) bei 37°C unter einem Gasgemisch von 25% O_2 , 5% CO_2 und 70% N_2 inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Kulturen mehrfach mit einem Inversionsmikroskop (Diavert, Leitz, Wetzlar) beobachtet und photographiert.

Innerhalb von 24 Stunden schließen sich die Follikel-segmente unter Umkehr ihrer Polarität (sowohl struk-turell als auch funktionell) zu inside-out Follikeln (Abb.2, Zusammenfassung Tab.2).

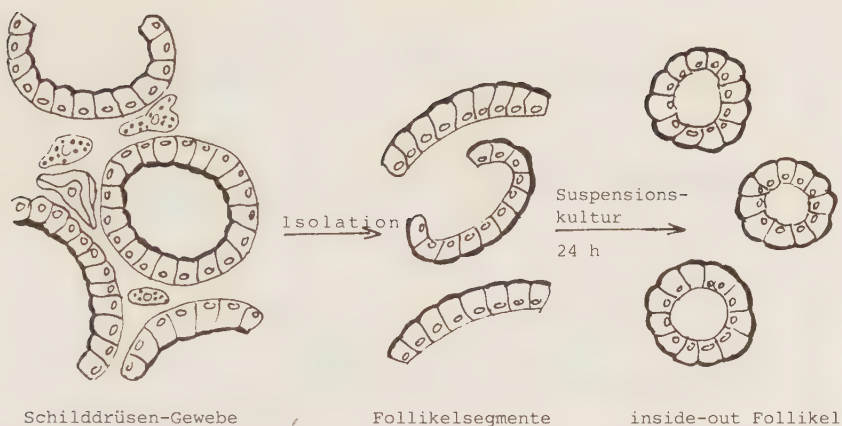


Abb. 2a Schematische Darstellung der Entstehung von inside-out Follikeln (nach Herzog 52). Schilddrüsen-gewebe wird zu Follikelsegmenten dissoziiert. Nach 24 Stunden Suspensionskultur schließen sich Follikelsegmente unter Umkehr ihrer Polarität zu inside-out Follikeln.
(Die apikale PM ist in der Abbildung schwarz markiert.)

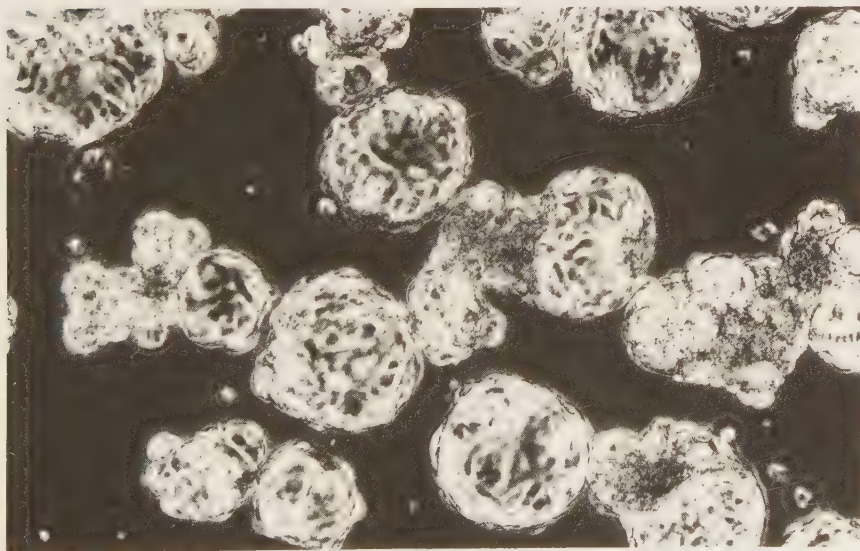


Abb. 2b Lichtmikroskopische Darstellung von inside-out Follikeln in Suspensionskultur.
(Aufnahme mit Diavert, Leitz, Vergr.: 200 x)

Präparationsschritt	Medium	Dauer	Temperatur	Bedingung
1. Drüsenentnahme einschl. Transport	auf Eis	30'	4°C	nicht steril
2. Kleinschneiden in Gewebewürfel von 1 mm Kantenlänge, Waschen	MEM	40'	RT	
3. Enzymatische Verdauung in Collagenase-Medium	MEM + 1 mg/ml Collagenase	30'	37°C	
4. Pipettieren in Collagenase-Medium (Dissoziation des Gewebes)	MEM + 1 mg/ml Collagenase	90'	37°C	
5. Erste Filtration durch Nylon-Gaze 250 µm	MEM	2'	RT	
6. Waschen	MEM + Pen + Strep + Ampho B	5'	RT	
7. Zweite Filtration durch Nylon-Gaze 200 µm	MEM + Pen + Strep + Ampho B	5'	RT	steril
8. Waschen 4 - 5 x	MEM + Pen + Strep + Ampho B steril filtriert	20'	4°C	
9. Suspensionskultur	MEM + 10% FKS + Pen + Strep + Ampho B	24 h	37°C	

Tabelle 2: Präparation von inside-out Follikeln (Zusammenfassung)

2.2.4 Durchführung der Experimente

a) Direkte Markierung der apikalen Plasmamembran mit WGA-Ferritin- und WGA-Gold-Konjugaten (Ein-Schritt-Methode)

Nach 24 Stunden Inkubation in FKS-haltigem Medium (Brutschrank) wurden inside-out Follikel-Suspensionen aus hydrophoben Kulturschalen in silikonisierte Zentrifugenröhrchen übertragen und 4 x mit FKS-freiem Eagle's Medium bei 4°C gewaschen.

Die Markierung der inside-out Follikel mit WGA-Ferritin- oder WGA-Gold-Konjugaten wurde bei 4°C in Polyethylene Tubes durchgeführt. Die gewaschenen inside-out Follikel wurden bei 70 x g pelletiert und danach im Verhältnis 1:1 in FKS-freiem Eagle's Medium resuspendiert. Zu jeweils 1 ml Follikelsuspension wurden zugegeben:

- a) 100 µl WGA-Gold-Lösung (eigene Präparation), oder
- b) 50 µl WGA-Ferritin-Lösung (eigene Präparation).

Die zur Absättigung der Bindungsstellen erforderlichen Markerkonzentrationen wurden empirisch ermittelt: eine konstante Follikelmenge wurde mit steigenden Markerkonzentrationen bei 4°C inkubiert. Unter Verwendung von Sättigungs- beziehungsweise Überschußkonzentrationen an Marker wurde bei 4°C nach 10-15 Minuten ein Bindungsgleichgewicht erreicht.

Die Inkubation in markerhaltigem Medium erfolgte bei 4°C unter ständigem leichtem Schütteln, um eine Sedimentation der Follikel zu verhindern und eine gleichmäßige Exposition der Zelloberflächen zu erreichen. Nach 15 Minuten wurden die Follikel 4 x mit kaltem, markerfreiem Medium gewaschen, in Karnovsky's Fixativ pelletiert (Mikrofuge-Tubes, 5 Minuten bei 1000 x g in der Labofuge 2, Heraeus) und dann für die Elektronenmikroskopie weiter bearbeitet.

Kontrollversuche:

Um eine unspezifische Adsorption der Markerpartikel an die apikale Plasmamembran auszuschließen, wurden folgende Kontrollversuche durchgeführt:

1. 1 ml Follikelsuspension wurde mit 2 ml einer kolloidalen Goldlösung (50 Å-Partikel; pH7) gemischt.
2. 100 µl einer 50 Å-BSA-Goldpräparation (Kopplung von BSA an kolloidales Gold siehe 2.2.1) wurden mit 1 ml Follikelsuspension gemischt.
3. 50 µl natives Ferritin (100 µl/ml; Miles Lab) wurden mit 1 ml Follikelsuspension gemischt.
4. Inhibitionsversuch: Um die spezifische Bindung von Gold- oder Ferritin-markiertem WGA an Kohlenhydratkomponenten der Plasmamembran zu inhibieren, wurde die Inkubation in Gegenwart von 0,2 M N-Acetyl-D-Glukosamin (MW 221) durchgeführt.

Die Follikel wurden in einem 1:1 Volumenverhältnis in Eagle's Medium mit 88,4 mg N-Acetyl-D-Glukosamin pro ml Medium resuspendiert. Zu jeweils 1 ml Follikelsuspension wurden gemischt:

- a) 100 µl WGA-Goldlösung (eigene Präparation)
- oder
- b) 50 µl WGA-Ferritinlösung (eigene Präparation)

Die Ansätze 1 - 4 wurden jeweils 15 Minuten bei 4°C unter mildem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Follikel 4 x mit kaltem Medium gewaschen, fixiert und für die Elektronenmikroskopie eingebettet.

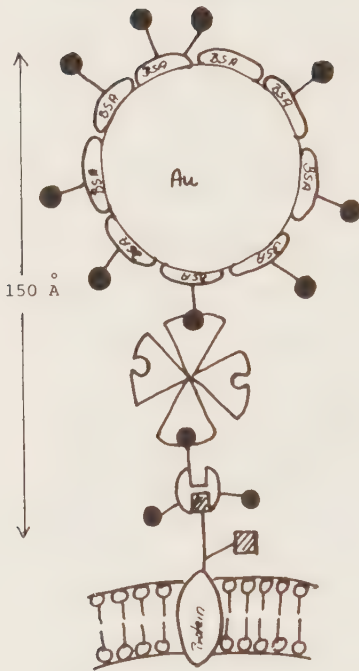
b) Indirekte Markierung der apikalen Plasmamembran
Drei-Schritt-Markierung unter Verwendung des
Avidin-Biotin-Systems

Prinzip:

Um Probleme der direkten Lektin-Ferritin- beziehungsweise Lektin-Gold-Konjugation zu umgehen, wurde eine drei-stufige Methode zur spezifischen Glykocalixmarkierung entwickelt.

Die indirekte Markierung umfaßt folgende Schritte:

1. Biotinylierung des Lektins (in dieser Arbeit WGA) und Adsorption des biotinylierten Lektins an Zellmembran.
2. Sättigung der an die Plasmamembran adsorbierten, biotinylierten Lektine mit freiem Avidin.
3. Bindung von biotinylierten $50 \text{ \AA}$ -Goldpartikeln an freie Bindungsstellen der exponierten Avidinmoleküle. Avidin ist ein Tetramer und besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin. Es kann somit als molekulare Brücke zwischen dem an die Plasmamembran adsorbierten, biotinylierten WGA und den biotinylierten Goldpartikeln fungieren (siehe Abb. 3)



Biotinyliertes 50 Å Goldpartikel
(Biotinyliertes BSA an Gold ge-
koppelt)

Avidin
(Molekulare Brücke zwischen bio-
tinylierten Proteinen)

Biotinyliertes WGA

Plasmamembran mit Glykocalyx

Abb. 3 Schematische Darstellung der indirekten Markierungsmethode

Eigenschaften von Avidin und Streptavidin

Avidin und Strptavidin sind Biotin-bindende Proteine. Avidin ist ein basisches Glykoprotein mit einem MW von 68.000, das in hoher Konzentration in Hühnereiweiß vorkommt. Avidin besitzt eine extrem hohe Affinität zu Biotin (Bindungskonstante 10^{15} M^{-1}) (40).

Streptavidin ist ein von Streptomyces produziertes Protein mit einem MW von 60.000, das die gleiche Affinität zu Biotin besitzt wie Hühnereiweiß-Avidin (18).

Streptavidin ist nicht glykosiliert und eignet sich deshalb für Markierungsmethoden mit Lektinen, da es im Gegensatz zum Glykoprotein Avidin keine Interaktionen mit Lektinen eingeht.

Biotinylierung biologisch aktiver Proteine

Prinzip:

Relativ stabile Proteine wie Antikörper, Lektine oder Polypeptidhormone können ohne Verlust ihrer biologischen Aktivität nach der Methode von Bayer und Skutelsky biotinyliert werden (8,9,10,104).

Biotinyl-N-Hydroxysuccinimide (BNHS) wird in Dimethylfluoramide (DMF) gelöst und zu einer Lösung des zu biotinylierenden Proteins gegeben. BNHS-Lösung und Protein-Lösung werden in einem 1:50 V/V und in einem 5:1 mol/mol-Verhältnis gemischt.

Der pH-Wert der Lösung soll auf pH 7 eingestellt sein. Die Lösung wird bei Raumtemperatur 4 Stunden inkubiert und über Nacht gegen PBS dialysiert (4°C, PBS einmal wechseln). Das biotinylierte Protein kann bei - 20°C aufbewahrt werden. Biotinylierte Proteine besitzen die Fähigkeit, Avidin zu binden. An jedem Proteinmolekül sind mehrere Biotinmoleküle kovalent gebunden.

Biotinylierung von WGA:

Lösungen:

BNHS (MW 340): 1,8 mg BNHS in 2 ml DMF
WGA (MW 18.000): 1 mg WGA in 5 ml PBS

Verhältnis BNHS/WGA

Volumen-Verhältnis:

100 µl BNHS : 5 ml WGA = 1:50

Mol-Verhältnis:

0,25 µMol BNHS : 0,05 µMol WGA = 5:1

Reaktion:

1 mg WGA in 5 ml PBS wurden mit 0,9 mg BNHS in 100 µl DMF gemischt. Nach 4 Stunden Inkubation bei Zimmertemperatur wurde das biotinylierte WGA gegen PBS dialysiert (4°C über Nacht)

Biotinylisierung von BSA:

Lösungen:

BNHS (MW 340): 1,3 mg BNHS in 1 ml DMF
BSA (MW 67.000): 5 mg BSA in 5 ml PBS

Verhältnis BNHS/BSA

Volumen-Verhältnis:

100 µl BNHS : 5 ml BSA = 1:50

Mol-Verhältnis:

0,13 mg BNHS : 5 mg BSA = 5:1

Reaktion:

5 mg BSA in 5 ml PBS werden mit 0,13 mg BNHS in 100 µl DMF gemischt. Nach 4 Stunden Inkubation wird gegen PBS dialysiert

Indirekte Biotinylisierung von kolloidalem Gold durch Kopplung von Biotin-BSA an 50 Å-Goldpartikel

Kolloidales Gold kann im Gegensatz zu Ferritin (10) nicht direkt biotinyliert werden.

Durch Kopplung biotinylierter Proteine (z.B. Biotin-BSA) an kolloidales Gold erhalten die Goldpartikel die Fähigkeit, Avidin zu binden. Die Konjugation von biotinyliertem BSA an 50 Å-Goldpartikel wurde nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt:

Zu 1 ml Biotin-BSA-Lösung (1 mg/ml) wurden 4 ml einer kolloidalen Goldlösung (50 Å-Partikel; pH 6) unter ständigem Rühren zugegeben.

Nach 5 Minuten Inkubation wurden die Protein-Gold-Konjugate durch Zugabe von 100 µl 5% PEG stabilisiert und 45 Minuten bei 125.000 x g (S 50,1 Rotor bei 4°C) zentrifugiert.

Durchführung der indirekten Markierung (Drei-Schritt-Methode)

Gewaschene inside-out Follikel wurden in FKS-freiem Eagle's Medium resuspendiert (Vol/Vol Verhältnis 1:1) und auf 4°C gekühlt.

1. Pro ml Follikelsuspension wurden 100 μ l einer Biotin-WGA-Lösung der Konzentration 1 mg/ml zugegeben. Die Follikel wurden unter leichtem Schütteln bei 4°C 15 Minuten im Biotin-WGA-Medium inkubiert. Danach wurden die Follikel 4 x in kaltem Medium gewaschen, um ungebundenes Biotin-WGA zu entfernen.
2. Zu den gewaschenen Follikeln wurde in PBS gelöstes Streptavidin zugegeben: 50 μ g Streptavidin in 5 μ l PBS für 1 ml Follikelsuspension. Nach 30 Minuten Inkubation im Streptavidin-Medium wurden die Follikel 4 x gewaschen.
3. Zu 1 ml Zellsuspension wurden 100 μ l einer Biotin-BSA-Goldlösung gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C unter leichtem Schütteln wurden die Follikel 4 x bei 4°C gewaschen, in Karnovsky's Fixativ pelletiert und wie unter 2.2.5 beschrieben für die Elektronenmikroskopie eingebettet.

Kontrollversuche:

Die Kontrollversuche wurden unter den gleichen Bedingungen wie die oben beschriebene indirekte Markierung durchgeführt. Es wurden 4 Ansätze nach folgendem Schema getestet:

Ansatz	Inkubationsschritt		
	1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt
1.	-	30' Streptavidin	30' Biotin-BSA-Gold
2.	-	-	30' Biotin-BSA-Gold
3.	15' Biotin-WGA	-	30' Biotin-BSA-Gold
4.	15' Biotin-WGA	30' Streptavidin	30' BSA-Gold

"-" bedeutet: 15' Inkubation in Marker-freiem Medium. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Follikel 4 x bei 4°C in Eagle's Medium gewaschen.

c) Endocytoseversuch

Ziel der Versuche war die Darstellung der intrazellulären Kompartimente, die sich an der Endocytose von glykosilierten Membrankomponenten beteiligen.

Die Endocytose-Versuche wurden unter TSH-Stimulation durchgeführt: Gewaschene, markierte Follikel wurden in 37°C warmem, TSH-haltigem Eagle's Medium (5 mU TSH/ml) resuspendiert. Die Follikelsuspension wurde in hydrophobe Kulturschalen übertragen und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

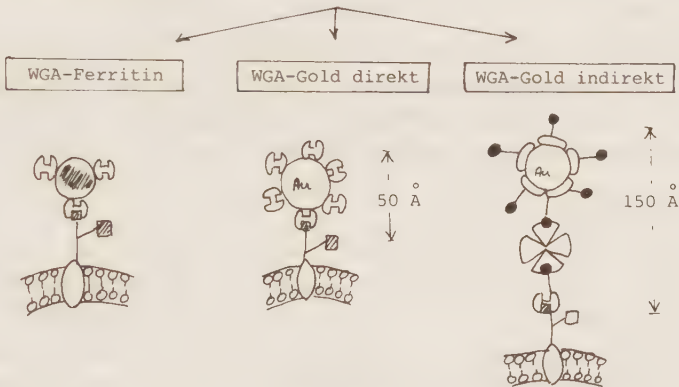
Nach 5, 10, 15, 30, 60 und 90 Minuten beziehungsweise nach 3, 5, 10, 24 und 48 Stunden wurden Proben entnommen: Dazu wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Eppendorf-Pipette (mit abgestumpfter Spitze) jeweils 1 ml Follikelsuspension entnommen.

Die Follikelsuspension wurde mit 4 ml kaltem Medium gemischt und 30 Sekunden bei 70 x g zentrifugiert (Labofuge II, Heraeus-Christ, Hanau).

Die abzentrifugierten Follikel wurden in 800 µl Karnovsky's Fixativ resuspendiert und 5 Minuten bei 1000 x g pelletiert (Mikrofuge, Bekman). Das Pellet wurde für die Elektronenmikroskopie weiter bearbeitet (siehe 2.2.5).

(Zusammenfassung: Tab. 3)

1. Markierung der Follikel bei 4°C; 4 x Waschen in Eagle's Medium



2. Resuspendieren der Follikel in warmem Medium 37°C

3. Endcytose bei 37°C

4. Probeentnahme nach: 5, 15, 30, 60, 90 min
5, 10, 24, 48 h

5. Pelletierung der Follikel in Karnovsky's Fixative

6. Vorbereitung der Follikel-Pellets für die Elektronenmikroskopie:

Fixation in Karnovsky's Fixativ 30-60' bei 4°C Spülen in Cacodylat-Puffer (0,1M; pH 7,2)

Membrankontrastierung in 1% OsO₄ 30' bei 4°C Spülen mit Cacodylat-Puffer

Entwässerung: Äthanol 95% 5' bei RT
Äthanol 100% 5' bei RT
Äthanol 100% über Sieb 2 x 10' bei RT

Propylenoxyd 1x20' u. 2x10' RT

Einbettung: Propylenoxyd: Epon 1:1, 10h b. RT
Epon 812 3-5 h bei RT

Aushärten: Epon 812 24-48 h bei 60°C

Tabelle 3: Endocytoseversuch (Zusammenfassung)

d) Sequentielle Doppelmarkierung von inside-out Follikelzellen

Prinzip:

Das Ziel dieses Experimentes war es, Lysosomen von Schilddrüsen-Follikelzellen mit kolloidalem Gold (= 1. Marker) vorzumarkieren und danach die Endocytose von cationisiertem Ferritin (= 2. Marker) zu beobachten.

Durchführung:

Inside-out Follikel wurden in der Kälte (4°C) mit WGA-Gold (50 Å-Partikel) markiert und danach 4 x steril gewaschen. Die Follikel wurden 10 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wurden (wie aus dem Endocytose-Experiment 2.2.4 c bekannt war) alle markierten Membrankomponenten von der Zelloberfläche endocytiert. Gleichzeitig kam es zu einer Akkumulation von kolloidalem Gold in Lysosomen, d.h. zu einer Vormarkierung der Lysosomen mit Gold. Nach 10 Stunden wurden die mit kolloidalem Gold vormarkierten Follikel 6 x in markerfreiem Medium gewaschen und danach in Medium mit cationisiertem Ferritin (= 2. Marker) resuspendiert.

Pro ml Follikelsuspension wurden 10 µg CF zugegeben. Die Follikel wurden in CF-Medium bei 37°C inkubiert, wobei eine Endocytose von CF stattfand.

Nach 5, 10, 15, 30, 60 und 90 Minuten beziehungsweise nach 3, 5 und 10 Stunden wurden Proben entnommen und wie unter 2.2.5 beschrieben weiter behandelt.

(Zusammenfassung siehe Tab. 4)

1. Marker WGA-Gold	1. Markierung von inside-out Follikeln mit WGA-Gold ; 3 x waschen in kaltem Eagle's Medium (4°C)
	2. 10 Stunden Endocytose bei 37°C im Brutschrank; 3 x waschen in Eagle's Medium
2. Marker CF	3. Zugabe von cationsiertem Ferritin 10 µg CF/ml; Endocytose bei 37°C
	4. Probeentnahme nach 5, 10, 15, 30, 60 und 90 min beziehungsweise nach 3, 5 und 10 h
	5. Vorbereitung der Follikel für die Elektronenmikroskopie

Tabelle 4: Sequentielle Doppelmarkierung
(Zusammenfassung)

2.2.5 Präparation der Follikel für die Elektronenmikroskopie

1. Fixation (nach Karnovsky) (65)

Die abzentrifugierten Follikel wurden in 800 µl Karnovsky's Fixativ (3% Glutaraldehyd mit 1% Formaldehyd in 0,1 M Cacodylat-Puffer resuspendiert und in Mikrofuge-Tubes übertragen. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 1000 x g (Beckman Mikrofuge 152, Beckman Instr.) wurden die Follikel-Pellets aus den Zentrifugenröhrchen herausgeschnitten und für 1 Stunde bei 4°C in Karnovsky's Fixativ weiter fixiert. Die Pellets wurden danach in Cacodylat-Puffer (0,1 M; pH 7,2) gewaschen und 1 Stunde bei 4°C in 1% OsO₄ nachfixiert.

2. Entwässerung (bei Raumtemperatur)

Die Entwässerung erfolgte in einer Alkoholreihe steigender Konzentration (5 min 95% Alkohol, 2x10 min 100% Alkohol, 2x10 min 100% Alkohol über Sieb) und danach in Propylenoxyd (1x20 min und 2x10 min).

3. Einbettung in Epon nach Luft (69)

Zur Penetration des Einbettungsmaterials wurden die Pellets 12 Stunden bei Raumtemperatur einem 1:1 Gemisch aus Epon und Propylenoxyd ausgesetzt.

Danach wurden die Pellets für 3 Stunden in reines, frisch zubereitetes Epon 812 übertragen.

Die Einbettung erfolgte in Flachformen.

Die Aushärtung des Epons bei 60°C dauerte 24 Stunden.

4. Ultradünnschnitte

Von den eingebetteten Proben wurden an einem Ultratom (Ultratome III, LKB Produkter, Stockholm, Schweden) mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit Blei-Citrat nach Reynolds (89) gefärbt und mit einem Elektronenmikroskop (Siemens Elmiskop I) bei 80 kV untersucht.

Von geeigneten Schnitten wurden Aufnahmen bei Vergrößerungen von 5000 - 20.000 x angefertigt.

2.3 Anhang

Kritische Anmerkungen zur Verwendung von Lektin-Gold- und Lektin-Ferritin-Konjugaten als Membranmarker

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine spezifische Markierungsmethode für die Glykocalix der apikalen Plasmamembran von Schilddrüsenzellen auszuarbeiten. Um Lektine elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen, wurden sie mit elektronendichten Tracern (kolloidalem Gold oder Ferritin) konjugiert. Durch Konjugation mit Tracern werden die biologischen Eigenschaften von Lektinen (z.B. ihre Fähigkeit, spezifisch an Zucker zu binden) nicht gestört.

Um Vor- und Nachteile der Methode verständlich zu machen, wird im folgenden auf die biologischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften der an der Markierung beteiligten Komponenten (Lektine und elektronendichte Tracer) eingegangen.

2.3.1 Eigenschaften von Lektinen und ihre Anwendung zur Untersuchung von Kohlenhydratkomponenten von Zelloberflächen

a) Natur der Lektin-Zucker Bindung

Lektine sind Proteine pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die die Eigenschaft besitzen, spezifisch an freie oder membrangebundene Zuckermoleküle zu binden. Jedes Lektinmolekül besitzt zwei oder mehrere Kohlenhydratbindungsstellen. Man stellt sich die Bindungsstellen als mulden- beziehungsweise spaltförmige Regionen des Lektinmoleküls vor, die komplementär zu einem Zuckermolekül beziehungsweise zu einer Kombination von mehreren Zuckern eines Oligosaccharids passen (99,78). So z.B. bindet Wheat Germ Agglutinin (WGA), ein aus Weizenkeim isoliertes Lektin an β 1 - 4 gebundene Monomere von N-Acetyl-D-Glukosamin. Phythämagglutinin (PHA), ein aus roten Bohnen isoliertes Lektin bindet an die Sequenz: D-Galactose-(1 - 4)-D-Glukose-N-Acetyl-Neuraminsäure-(1 - 2)-D-Mannose. Die Lektin-Zucker Bindung ist relativ schwach und reversibel. So kann z.B. durch Zugabe des spezifischen Zuckers im Überschuß die Interaktion von Lektinen mit Zelloberflächen kompetitiv gehemmt werden. (Prinzip einer Gleichgewichtsreaktion, bei der freie Zuckermoleküle und membrangebundene Kohlenhydrate um Bindungsstellen am Lektinmolekül konkurrieren.)

b) Vergleich der Lektin-Zucker Bindung mit der
Antigen-Antikörper Bindung

Die Natur der Lektin-Zucker Bindung ist nicht-kovalent. Sie beruht auf Wasserstoff-Brückenbindung, Dipol-Wechselwirkung, Van-der-Waals-Kräften und elektrostatischen Anziehungskräften zwischen bestimmten Seitengruppen des Zuckermoleküls und Atomgruppen der Bindungsstelle im Lektinmolekül. Es handelt sich dabei um dieselben Bindungskräfte, die auch bei Antigen-Antikörper- und bei der Enzym-Substrat Bindung wirksam werden (99,33,87).

Die Bindungskonstante K_a ist ein Maß für die Affinität der Interaktion zwischen Ligand und Bindungsstelle. Die Bindungskonstanten von Lektin-Zucker Interaktionen liegen in einem Bereich von $K_a = 10^3$ bis $K_a = 10^4$ und damit niedriger als die Bindungskonstanten der Antigen-Antikörper- oder Enzym-Substrat-Wechselwirkung, die eine Größenordnung von $K_a = 10^4$ bis $K_a = 10^{10}$ haben. Die Lektin-Zucker Interaktion ist weniger spezifisch als die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung (100).

Lektine unterscheiden sich in ihrer Spezifität: Es gibt Lektine mit einer hohen Spezifität für nur einen einzigen Zucker (z.B. Soyabohnen-Agglutinin für N-Acetyl-Galactosamin). Andere Lektine sind weniger spezifisch und können an verschiedene Zucker binden (z.B. Concanavalin A bindet an L-D-Mannopyranoside, L-Glukopyranoside und α -N-Acetyl-D-Glukosaminide).

WGA gehört zu den Lektinen mit relativ hoher Spezifität. Deshalb und wegen seiner guten Bindungsfähigkeit an die apikale Plasmamembran von Schilddrüsenzellen wurde WGA als Glykocalixmarker für Endocytosestudien ausgewählt.

c) Biologische Eigenschaften von Lektinen

Neben der charakteristischen, allen Lektinen gemeinsamen Eigenschaft, Zucker zu binden, besitzen einige Lektine eine Reihe zusätzlicher interessanter biologischer Eigenschaften wie z.B. Blutgruppenspezifität, Mitogenität, Toxicität oder die Fähigkeit, maligne Zellen zu agglutinieren.

In der folgenden Tabelle sind einige Lektineigenschaften und Beispiele für ihre Anwendung aufgeführt:

Lektineigenschaft	Anwendung
Spezifische Bindung an Kohlenhydrate	Untersuchung der Zusammensetzung und Struktur von KH-Komponenten von Zelloberflächen
Präzipitation von Polysacchariden und Glykoproteinen	Isolation und Reinigung von KH-haltigen Polymeren
Blutgruppenspezifität	Strukturelle Untersuchung von Blutgruppenderminanten
Mitogenität	Induktion der Mitose von Lymphoblasten; Chromosomenuntersuchungen
Agglutination maligner Zellen	Untersuchung von Zelloberflächen nach Transformation
Toxicität	Bedeutung des Lektinergehalts in Futtermitteln

(modif. nach Sharon N; Liss H; Science, 1972)

Tabelle 5: Eigenschaften von Lektinen und ihre Anwendung

Einige biologische Eigenschaften wie Toxizität, Mitogenität oder agglutinierende Wirkung können bei der Anwendung von Lektinen für experimentelle Zwecke störend wirken.

Die zur Membranmarkierung erforderlichen Lektinkonzentrationen sind jedoch so niedrig (Größenordnung von $0,1 \mu\text{g/ml}$), daß störende Effekte nicht wirksam werden.

Wir haben inside-out Follikel 3 - 4 Tage lang in Anwesenheit von Lektinen ($0,1 \mu\text{g/ml}$) oder Lektin-Tracer-Konjugaten ($100 \mu\text{l/ml}$) bei 37°C in Kultur gehalten und dabei keine morphologischen oder funktionellen Veränderungen der Schilddrüsenzellen festgestellt.

2.3.2 Eigenschaften von Lektin-Ferritin und Lektin-Gold-Konjugaten

Probleme bei der Herstellung von Lektin-Gold-Konjugaten

Lektin-Gold-Konjugate wurden selbst hergestellt, weil mit Hilfe eines colorimetrischen Tests (66) gezeigt werden konnte, daß selbst hergestellte Konjugate den käuflichen Präparationen überlegen sind.

Bei der Präparation von kolloidalen Goldlösungen und bei der Kopplung von Proteinen an kolloidales Gold ergibt sich das Problem der Präzipitationsneigung. Um eine Präzipitation von kolloidalem Gold zu verhindern, müssen Konzentrationen des zu adsorbierenden Proteins, Ionenkonzentration und pH-Wert der Lösung optimal eingestellt werden. Im folgenden werden einige Eigenschaften von kolloidalen Lösungen und von Lektin-Gold-Konjugaten erklärt.

Eigenschaften von kolloidalen Lösungen

Kolloidales Gold liegt als negativ geladene hydrophobe Lösung vor. Die Stabilität der Lösung beruht auf elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen den Goldpartikeln (120). Kolloidale Goldpartikel bestehen aus einem positiv geladenen Gold-Kern und einer mehrschichtigen, negativ geladenen Ionenwolke. Die Ionenhülle bewirkt elektrostatische Abstoßung zwischen den einzelnen Goldpartikeln und ist so für die Stabilität des kolloidalen Goldes verantwortlich.

Zugabe von Elektrolyten verändert die elektrochemische Umgebung der Goldpartikel. Kohäsionskräfte zwischen den Goldkernen werden wirksam und führen zur Bildung von Goldaggregaten und somit zur Ausflockung der Lösung. (Durch Elektrolyte wird die Ionenhülle der Goldpartikel komprimiert; die Distanz zwischen benachbarten Goldpartikel-Zentren verringert sich. Unterhalb einer kritischen Distanz, die bisher noch nicht genau definiert wurde, kommt es durch Überlappen der Ionenatmosphären benachbarter Partikel zur Kohäsion) (29,118,64).

Eigenschaften von Protein-Gold-Konjugaten

Zugabe von Proteinen hat eine stabilisierende Wirkung auf kolloidale Goldlösungen (64). Positiv geladene Seitengruppen der Proteinmoleküle treten mit der negativ geladenen Ionenhülle der Goldpartikel in Wechselwirkung und bilden stabile, nicht-kovalente Protein-Gold-Komplexe (95,80).

Da die Protein-Gold-Wechselwirkung nicht kovalent ist, werden die Eigenschaften der Proteine durch ihre Kopplung an Gold nicht wesentlich verändert (59,93).

Die Proteinmoleküle bilden eine schützende Hülle um die Goldpartikel. Durch Adsorption von Proteinmolekülen an Goldpartikel werden die Kohäsionskräfte zwischen Goldpartikeln vermindert und die Stabilität der Lösung erhöht. Die hydrophobe kolloidale Goldlösung wird durch Proteinzugabe zu einer hydrophilen kolloidalen Lösung aus Protein-Gold-Konjugaten, die viele Eigenschaften einer Proteinlösung annimmt.

Die Adsorption von Proteinen an kolloidales Gold ist pH-abhängig und wird von Konzentration, Oberflächenspannung, Löslichkeit und elektrischer Ladung der Proteinmoleküle beeinflusst (29,31).

Einfluß der Ionenkonzentration

Höhere Salzkonzentrationen können die Kopplung von Proteinen an kolloidales Gold verhindern, indem sie mit der negativen Oberflächenladung der Goldpartikel interferieren. Um diesen Effekt zu umgehen, werden grundsätzlich nur salzfreie beziehungsweise dialysierte Proteinlösungen zu kolloidalen Goldlösungen gegeben.

Einfluß des pH-Wertes

Die Adsorption von Proteinen an kolloidales Gold ist pH-abhängig. Während pH-Änderungen die Ladung von Proteinmolekülen beeinflussen, haben sie keinen Effekt auf die Ladung von kolloidalen Goldpartikeln. Die Stärke der Ladung des zu adsorbierenden Proteins ist umgekehrt proportional zur Stabilität der Protein-Gold-Lösung. Das höchste Maß an Stabilität und Adsorption wird daher erreicht, wenn die Kopplung im Bereich des isoelektrischen Punktes des Proteins (beziehungsweise leicht oberhalb davon) durchgeführt wird (31).

Einfluß der Protein-Konzentration

Die Proteinmenge, die zur Stabilisierung von kolloidalem Gold erforderlich ist (Sättigungskonzentration), muß für jedes Protein anhand einer Konzentrations-Isotherme ermittelt werden (siehe Methoden) (28,61,59).

Markierung von Kohlenhydrat-Komponenten der Plasmamembran mit Lektin-Gold-Konjugaten: direkte und indirekte Markierungsmethode

Um einen geeigneten Glykocalixmarker für die apikale Plasmamembran von Schilddrüsenfollikelzellen zu finden, wurde die Bindung von verschiedenen Lektinen getestet.

Um die Herstellung einer großen Anzahl von verschiedenen Lektin-Gold-Präparationen zu vermeiden, wurde eine indirekte Markierungsmethode gewählt, bei der die Herstellung von nur einer einzigen Protein-Gold-Präparation (BSA-Gold) erforderlich war.

Die an die Membran gebundenen Lektine wurden elektronenmikroskopisch dargestellt, indem sie über eine Avidinbrücke mit biotinylierten BSA-Gold-Partikeln markiert wurden (siehe Methoden). Neben dem Vorteil, daß mit demselben Markermolekül (Biotin-BSA-Gold) verschiedene Lektine gleichzeitig nachgewiesen werden können, bietet die indirekte Markierungsmethode noch weitere Vorteile:

1. Durch die Biotin-Avidin Brücke wird der Abstand zwischen Goldpartikel und Membran vergrößert. Die Wahrscheinlichkeit von störenden, unspezifischen Wechselwirkungen zwischen Markerpartikel und Membran ist dadurch vermindert.

2. Das biotinylierte, an die Membran gebundene Lektin ragt wie ein "Arm" über die Membranebene hinaus und bietet für Avidin und danach für biotinyliertes Gold eine gut zugängliche Bindungsstelle. Durch die indirekte Markierung unter Zwischenschaltung des Avidin-Biotin-Systems als Verbindungsarm zwischen Lektin und Goldpartikel werden sterische Probleme umgangen: bei direkt an Gold gekoppelten Lektinen tritt in manchen Fällen (besonders bei der Verwendung von großen Goldpartikeln ($> 30 \text{ nm}$)) eine räumliche Behinderung der Bindung des Lektins an die Membran auf (31).
3. Biotinylierung hat eine weniger eingreifende Wirkung auf die biologische Aktivität von Proteinen als ihre Konjugation mit Goldpartikeln. Es ist daher zu erwarten, daß biotinylierte Lektine bei ihrer Bindung an die Membran weniger unphysiologische Effekte ausüben als goldkonjugierte Lektine.

Bei Endocytosestudien kann durch die Verwendung von biotinylierten Lektinen und ihre indirekte Markierung der Einfluß der Goldpartikel auf den Ablauf der Endocytose vermindert werden.

Der entscheidende Nachteil der indirekten Methode liegt darin, daß mit ihr nur eine viel schwächere Markierungsdichte als mit der direkten Methode erzielt werden kann. Aus diesen Grund wurde in der vorliegenden Arbeit für Endocytosestudien die direkte Markierungsmethode gewählt.

Vorteile von Lektin-Gold-Konjugaten gegenüber Lektin-Ferritin-Konjugaten

Um den Einfluß von Goldpartikeln auf den Endocytoseweg auszuschließen, wurden neben Lektin-Gold-Konjugaten auch Lektin-Ferritin-Konjugaten als Marker verwendet. Die Markierung von Zellen mit Lektin-Ferritin-Konjugaten weist gegenüber der Markierung mit Lektin-Gold-Konjugaten einige Nachteile auf:

1. Ferritinpartikel sind weniger elektronendicht als Goldpartikel und lassen sich dadurch intrazellulär weniger leicht von der "background granularity" abgrenzen. Besonders in Lysosomen ergibt sich die Schwierigkeit, das als Marker verwendete Ferritin vom endogenen Ferritin der Zelle zu differenzieren.
2. Ein weiterer Nachteil ist, daß die Herstellung von Lektin-Ferritin-Konjugaten aufwendiger ist als die Herstellung von Lektin-Gold-Konjugaten, weil sie eine größere Anzahl von Reinigungsschritten erfordert.
3. Die Bindung zwischen Lektin und Ferritin ist kovalent. Daher ist zu erwarten, daß eine Konjugation mit Ferritin einen größeren Einfluß auf die biologische Aktivität des Lektins ausübt als die nicht-kovalente Bindung des Lektins an Gold.

3. ERGEBNISSE

3.1 Selektive Markierung der apikalen Plasmamembran von inside-out Follikeln

Aus Schweineschilddrüsen isolierte Follikelsegmente schließen sich in Suspensionskultur (10% FKS) innerhalb von 24 Stunden zu Follikeln mit einer strukturellen und funktionellen inside-out Polarität (46). Die inside-out Polarität der Follikel in vitro ist unter Suspensionsbedingungen stabil: die apikale Plasmamembran ist gegen das Kulturmedium gerichtet, während die basale Plasmamembran das neu gebildete Follikellumen begrenzt. Das Follikellumen erscheint licht- und elektronenmikroskopisch leer. Neusynthetisiertes Thyreoglobulin wird, anders als in situ, nicht im Follikellumen gespeichert, sondern an der apikalen Plasmamembran ins Kulturmedium ausgeschieden (Autoradiographische Untersuchungen, Herzog, 1981) (48).

Damit entspricht der vektorielle Transport von neusynthetisiertem Thyreoglobulin zur apikalen Plasmamembran (= funktionelle Polarität) der umgekehrten strukturellen Polarität der Zelle.

Inside-out Follikel (Abb. 2b) haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 50 - 150 μm . Sie werden von einem einschichtigen Epithel aus polaren Schilddrüsenzellen gebildet. Die apikale, dem Medium zugewandte Plasmamembran ist durch tight junctions von der basolateralen Plasmamembran getrennt. Tight junctions stellen eine für Makromoleküle (z.B. CF oder TG) unpassierbare Barriere dar: damit ist das Follikellumen der inside-out Follikel gegen Diffusion von Makromolekülen aus dem Kulturmedium (= extrafollikulärer Raum) abgedichtet.

Die apikale Plasmamembran kann selektiv markiert werden, indem inside-out Follikel in Marker-haltigem Medium inkubiert werden.

Apikale und basolaterale Plasmamembran unterscheiden sich entsprechend der polaren Organisation der Schilddrüsen-follikelzelle in ihrer Zusammensetzung und Funktion. In der folgenden Tabelle (Tab. 6) sind die wichtigsten Merkmale zusammengefaßt:

Membran-domäne	Topographische Charakteristika	Strukturelle Charakteristika	Kompositionelle Charakteristika
apikal	gegen das Kulturmedium gerichtet	1 - 2 zentrale Zilien; Mikrovilli; Glykocalix; Coated pits; Pseudopodien	Thyreoperoxidase NADPH-Oxidase Aminopeptidase Anionische Gruppen
tight junctions			
lateral	Grenze zum Interzellularspalt	Gap junctions Desmosomen Interdigitations Coated pits	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ Transportsystem für Jodid
basal	begrenzt das Follikellumen	Fingerförmige Projektionen; Coated pits	Fibronectin-Bindungsstellen

Tabelle 6: Polare Verteilung von Membrankomponenten in inside-out Follikeln (nach Herzog 1984) (52)

Polare Organisation der Follikelzelle

Tight junctions trennen die Plasmamembran der polaren Zelle in sogenannte Makrodomänen: apikale Plasmamembran und basolaterale Plasmamembran. Durch die Zweiteilung der Membran wird die funktionelle Asymmetrie der Epithelzelle gewahrt, d.h. es kann gerichteter intrazellulärer Transport (z.B. von Thyreoglobulin) stattfinden.

Die apikale Plasmamembran trägt die Proteine Thyreoperoxidase (73,123), NADPH-Oxidase (73) und Amino-peptidase (63) und erfüllt die Funktion der Iodination von Thyreoglobulin (22).

Die apikale Plasmamembran ist in ihrem Aufbau heterogen: sie ist in mehrere Mikrodomänen unterteilt, die sich in Struktur und Aufbau voneinander unterscheiden. Beispiele für Mikrodomänen der apikalen Plasmamembran sind coated pits und Mikrovilli.

- Coated pits sind meist an der Basis von Mikrovilli lokalisiert. Es handelt sich um Membraninvaginationen ($\varnothing$ 0,3 μ m) die an ihrer cytoplasmatischen Seite einen elektronendichten Saum aus Clathrin tragen. Clathrin ist ein großes faseriges Proteinmolekül und bildet an der cytoplasmatischen Seite von coated pits eine Art Netzwerk (85,86). Coated pits spielen bei der adsorptiven Endocytose von spezifischen Liganden eine Schlüsselrolle: man nimmt an, daß es in coated pits zu einer selektiven Aggregation von Membranrezeptoren kommt (37).

- Mikrovilli sind fingerförmige Membranprojektionen der apikalen Plasmamembran, die zu einer Oberflächenvergrößerung um das 4 - 5 fache führen (125,23).

Mikrovilli tragen eine dichte Glykocalix.

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, die Glykocalix spezifisch zu markieren und ihr Schicksal nach Internalisierung zu verfolgen.

3.2 Auswahl eines Lektins als Glykocalixmarker für die apikale Plasmamembran von Schilddrüsen-follikelzellen

Prinzip:

Lektine sind Proteine, die die Eigenschaft besitzen, an freie oder membrangebundene Zuckermoleküle beziehungsweise Zuckerkombinationen zu binden. Jedes Lektin ist für einen oder mehrere Zucker spezifisch: so z.B. bindet Wheat Germ Agglutinin (WGA), ein aus Weizenkeim isoliertes Lektin an β 1 $\rightarrow$ 4 gebundene Monomere von N-Acetyl-D-Glucosamin und dessen Derivate N-Acetyl-Chitobiose und N-Acetyl-Neuraminsäure. Concanavalin A (Con A) bindet an L-D-Mannose. (Weitere Beispiele siehe Tab. 7)

Man kann Kohlenhydrat-Komponenten von Zelloberflächen identifizieren, indem man die Bindung von markierten Lektinen mit unterschiedlicher Zuckerspezifität testet. Bindet ein Lektin, so kann daraus geschlossen werden, daß der zu diesem Lektin komplementäre Zucker auf der Zelloberfläche vorhanden ist.

Bindung von 6 markierten Lektinen mit unterschiedlicher Zuckerspezifität an die apikale Plasmamembran von inside-out Follikeln

Es wurde eine Auswahl von 6 Lektinen mit unterschiedlicher Zuckerspezifität getroffen (siehe Tab. 7):

Lektin	Herkunft	Zucker- spezifität	MG	Bindungs- stellen	Mito- genität
Concanavalin A	Canavalia ensi- formis (Jack bean)	-D-Mannose	55.000	2	Ø
WGA Wheat Germ Agglutinin	Triticum vulgaris (Weizenkeim)	N-Acetyl-D- Glucosamin	18.000	2	Ø
Soyabohnen- Agglutinin	Glycine max (Soyabohne)	N-Acetyl-D- Galactosamin	110.000	2	+
Peanut Agglutinin	Arachis hypogaea (Erdnuß)	D-Galactose		2	Ø
Asparagus pea Agglutinin	Lotus tetragon- lobus (Spargel- bohne)	-L Fucose	120.000	4	+
Horse-Shoe Crab Agglutinin	Limulus polyphemus	Sialyl-Säure	400.000	2	Ø

(modifiziert nach Sharon, Science Sept. 1972, Vol. 177) (100)

Tabelle 7: Lektine; Zuckerspezifität und chemische Eigenschaften

Die Lektine wurden elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht, indem sie mit der indirekten Methode mit 50 Å - Goldpartikeln markiert wurden (s. Methoden 2.2.1). Aufgrund der Bindungsfähigkeit von markierten Lektinen sollte eine grobe Orientierung über die Art der exponierten Zuckerreste an der apikalen Plasmamembran von inside-out Follikeln gewonnen werden. Das am besten, d.h. mit der höchsten Affinität bindende Lektin sollte als spezifischer Membranmarker für Endocytoseversuche eingesetzt werden.

Jeweils 1 ml einer Suspension von inside-out Follikeln wurde mit einem der sechs Lektine (Tab.7) nach der indirekten Drei-Schritt-Methode (2.2.3) markiert und für die Elektronenmikroskopie eingebettet.

Die Auswertung der Ultradünnschnitte brachte folgendes Ergebnis:

- 1) mit WGA markierte Follikel tragen eine regelmäßige und dichte Markierung der Glykocalix mit 50 Å - Goldpartikeln (Abb. 4a)
- 2) Follikel, die mit einem der restlichen 5 Lektine markiert wurden, zeigen eine nur schwache und unregelmäßige Bindung von Goldpartikeln, häufig in Form von Aggregaten (Abb. 4b).

Daraus kann geschlossen werden, daß der zu WGA komplementäre Zucker N-Acetyl-D-Glucosamin in hoher Konzentration und in gut zugänglicher Position in der Glykocalix von inside-out Follikeln vorkommt. Die restlichen untersuchten Zucker (D-Glucose, N-Acetyl-D-Galactosamin, D-Galactose, L-Fukose und Sialylsäure) sind entweder in einer für Lektine nicht zugänglichen Position (wie z.B. die Sialylsäure) oder nur in niedriger Konzentration vorhanden.

Aufgrund seiner guten Bindungsfähigkeit an die apikale Plasmamembran von inside-out Follikeln wurde WGA als Glykocalixmarker für Endocytoseversuche ausgewählt.



Abb. 4a



Abb. 4b

Abb. 4 Bindung von Gold-markierten Lektinen an die apikale Plasmamembran von inside-out Follikeln

- a) Regelmäßige, dichte Markierung der Glykocalix mit WGA-Gold (Vgr.: 92.800 x)
- b) Unregelmäßige, schwache Markierung der Glykocalix mit Con A-Gold (Vgr.: 106.000 x)

3.3 Morphometrische Bestimmung der Markierungsdichte nach Markierung der apikalen Plasmamembran mit spezifischen Glykocalixmarkern (Vergleich von drei Markierungsmethoden)

Markierungsmethoden

Um das an die Plasmamembran gebundene WGA elektronenmikroskopisch darzustellen, wurden drei unterschiedliche Markierungsmethoden angewendet:

1. Konjugation von WGA mit nativem Ferritin
- WGA-Ferritin
2. Konjugation von WGA mit 50 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ kolloidalem Gold
- WGA-Gold direkt
3. Markierung von WGA mit 50 $\overset{\circ}{\text{\AA}}$ kolloidalem Gold über eine Avidin-Biotin-Brücke - WGA-Gold indirekt

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

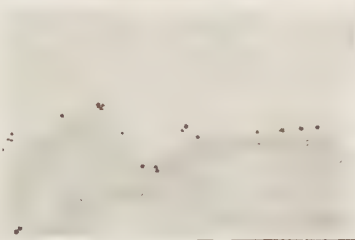
Markierungsmethode	schematische Darstellung	Membran-Marker Abstand	Markierungs-dichte
1. WGA-Ferritin 		50 - 100 Å	Partikel/mm $6,6 \cdot 10^5$
2. WGA-Gold (direkt) 		50 - 100 Å	$1,3 \cdot 10^5$
3. WGA-Gold (indirekt) 		150 - 300 Å	$1,4 \cdot 10^4$

Tabelle 8: Markierungsdichte und Abstand der Markerpartikel von der Membran

Mit allen drei Methoden wurde eine regelmäßige Markierung der Glykocalix der apikalen Plasmamembran erzielt (Abb. 5a-c).

In der Abhängigkeit von der Art des Markerpartikels (Gold oder Ferritin) beziehungsweise der Art der Bindung zwischen Markerpartikel und Lektin (direkt oder indirekt) weist die Markierung der Membran unterschiedliche Dichten auf. Das bedeutet, daß die drei Markierungsmethoden unterschiedliche Sensitivität besitzen. Um ein Maß für die Sensitivität der Methode und damit eine Vorstellung von der Größenordnung der Dichte der Lektinbindungsstellen zu entwickeln, wurde die Anzahl von Markerpartikeln pro Längeneinheit Membran morphometrisch bestimmt.

Morphometrie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Follikelzellen (Vergr. 12.000 x) wurden morphometrisch analysiert, indem Abschnitte der apikalen Plasmamembran mit einem halbautomatischen Bildanalysator (MOP/AM 03, Kontron, München) ausgemessen und die dort vorhandene Partikelzahl bestimmt wurden. Zum Zählen der Partikel wurde eine binokuläre Stereolupe (Leitz-Wild-Stereomicroscope M3, Leitz, München) in einem Arbeitsabstand von 26,5 cm verwendet. Die Markierungsdichte wurde als Partikelzahl pro Mikrometer (μm) Membranlänge ausgedrückt.

Die Ergebnisse beruhen auf der Auswertung von insgesamt 60 Zellen (20 pro Markierungsmethode). Pro Zelle wurden 2 - 3 Abschnitte der apikalen Plasmamembran von jeweils 5 μm Länge analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefaßt: es wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung angegeben.



Abb. 5a



Abb. 5b



Abb. 5c

Abb. 5 Markierungsdichte nach Markierung der apikalen Plasmamembran mit spezifischen Glykocalyxmarkern

- a) WGA-Ferritin (Vgr. 81.000 x)
- b) WGA-Gold, direkte Methode (Vgr. 81.000 x)
- c) WGA-Gold, indirekte Methode (über Avidin-Biotin-Brücke (Vgr. 90.000 x)

Kontrollversuche

Um die Spezifität der Bindung von mit elektronendichten Tracern markiertem WGA an die Glykocalyx zu prüfen, wurden Kontrollversuche mit WGA-freien Tracern durchgeführt (siehe Methoden 2.2.4). Die Auswertung der Kontrollversuche ergab, daß unkonjugiertes kolloidales Gold, BSA-Gold und natives Ferritin keine unspezifische Bindung an die apikale Plasmamembran von inside-out Follikeln zeigen. Wird die Lektin-Markierung in Anwesenheit des komplementären Zuckers durchgeführt (Inhibitionsversuch), so bindet das Lektin nicht an die Membran, weil alle Zuckerbindungsstellen am Lektinmolekül mit freiem Zucker abgesättigt sind.

3.4 Endocytose von WGA-Ferritin und WGA-Gold Konjugaten

3.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es wurden Endocytoseexperimente durchgeführt mit:

1. WGA-Ferritin markierten inside-out Follikeln
2. WGA-Gold (direkt) markierten inside-out Follikeln
3. WGA-Gold (indirekt) markierten inside-out Follikeln

Die markierten, gewaschenen Follikel wurden in Marker-freiem, TSH-haltigen Medium bei 37°C inkubiert. Nach 5, 15, 30, 60 Minuten und nach 3, 5 und 10 Stunden wurden Proben entnommen und für die Elektronenmikroskopie eingebettet.

Die Versuche wurden ausgewertet, indem von jedem Zeitpunkt pro Markierungsmethode mindestens 20 Zellen elektronenmikroskopisch untersucht und teilweise photographiert wurden.

Es wurden drei verschiedene Markierungsmethoden angewendet, um Einflüsse von Markermolekülen auf das Verhalten markierter Komponenten und auf die Zellfunktion zu erfassen.

Die qualitative Auswertung der Versuche ergab, daß in allen drei Fällen die markierten Membrankomponenten der gleichen intrazellulären Route folgen. Die Kinetik des Endocytosevorgangs zeigte keine Unterschiede. Daraus wurde geschlossen, daß der Marker keinen Einfluß auf die Route hat oder daß alle Marker den gleichen störenden Effekt ausüben. Im folgenden wird der Endocytoseweg von WGA-Ferritin und WGA-Gold-markierter Glykocalyx zusammengefaßt:

- Nach Erwärmen der Follikel auf 37°C und TSH-Stimulation beobachtet man dicht markierte coated pits an der Basis von Mikrovilli: Coated pits werden von der Membran abgeschnürt und bilden coated vesicles.

- Nach ungefähr 1 Minute Endocytose verlieren coated pits ihren Clathrin-coat und bilden glattwandige Endocytosevesikel. Endocytosevesikel transportieren an die Innenseite ihrer Membran gebundene Markerpunktikel zu Endosomen.

Endosomen sind durch Bindung der Markerpunktikel an die Innenseite ihrer Membran, durch Abwesenheit von saurer Phosphatase in ihrem Lumen und durch tubuläre Fortsätze charakterisiert.

- Nach ungefähr 15 Minuten erreichen die Markerpunktikel an saurer Phosphatase reiche Lysosomen: Hier dissoziieren die Markerpunktikel von der Innenseite der Membran ab und akkumulieren in der Matrix der Lysosomen.
- Nach 15, 30 und 60 Minuten findet eine zunehmende Akkumulation von Markerpunktikeln in Lysosomen statt.
- Nach 5 Stunden beobachtet man eine deutliche Abnahme der Markierungsdichte der apikalen Plasmamembran, sowie eine Abnahme der Zahl von coated pits, Endocytosevesikeln und Endosomen. Die Zahl von markierten Lysosomen und ihre Markierungsdichte nehmen dagegen zu.
- Nach 10 Stunden ist die apikale Plasmamembran markerfrei. Die Markerpunktikel sind in Lysosomen akkumuliert.

Während einer 10 Stunden dauernden Endocytose von WGA-Ferritin oder WGA-Gold-markierter apikaler Plasmamembran werden Golgi Cisternen von Markerpunktikeln nicht erreicht.

Es findet auch kein transepithelialer Transport von WGA-markierter Membran statt, wie er z.B. bei der Markierung der Membran mit cationisiertem Ferritin oder Thyreoglobulin-Gold beobachtet wird (51).

Die Endocytose von mit WGA-Ferritin oder WGA-Gold markierter apikaler Plasmamembran folgt ausschließlich der lysosomalen Route (Abb. 6). Sie imitiert damit die physiologische Hauptroute von Thyreoglobulin das an der apikalen Plasmamembran endocytisiert und zu Lysosomen transportiert wird, wo eine partielle Hydrolyse zu Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) erfolgt (124, 68, 52).

Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß WGA möglicherweise unter anderem auch an Kohlenhydratkomponenten der Thyreoglobulin-Bindungsstelle bindet.

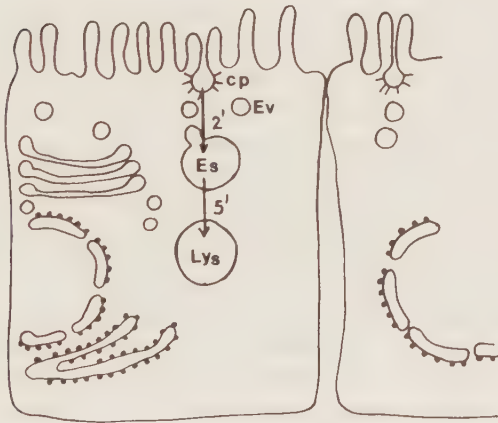


Abb. 6: Lysosomale Route (vereinfacht nach 52):

Endocytose von WGA-markierter, apikaler Plasmamembran (PM): Der Glykocalyxmarker WGA wird membrangebunden über coated pits (cp), coated vesicles (cv) und Endocytose Vesikel (EV) zu Endosomen (Es) transportiert. Nach ungefähr 5 min erreicht der Marker Lysosomen, wo er akkumuliert.

Ein Transport von WGA-markierter Membran zu Golgi-Cisternen oder zur basolateralen PM findet nicht statt.

3.4.2 Qualitative Beschreibung der Kinetik der Endocytose

Die Verteilung der Markierung zu verschiedenen Zeitpunkten des Endocytosevorgangs wurde nicht quantitativ erfaßt. Morphometrische Daten zum Membrantransport in inside-out Follikeln wurden aus Arbeiten von Herzog (51, 52) übernommen.

Das Hauptinteresse dieser Arbeit galt nicht kinetischen Aspekten des Membrantransports, sondern in erster Linie der morphologischen Charakterisierung der an der Endocytose beteiligten Kompartimente. Darum beruht die unten dargestellte Graphik der Endocytose von WGA-markierter Membran auf einer Schätzung der Markierungsstärke der einzelnen Kompartimente zu verschiedenen Zeitpunkten. Um das Maß an Objektivität bei der Schätzung zu erhöhen, wurde eine große Anzahl von elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgewertet; (Pro Zeitpunkt Ausschnitte von ungefähr 30 Zellen).

Als Maßzahl n wurde die Markierungsstärke im Kompartiment X zum Zeitpunkt Y gewählt. Die Größe "Markierungsstärke" umfaßt Anzahl der zum Zeitpunkt Y markierten Kompartimente und die dort vorhandene Markierungsdichte. Der Markierungsstärke n wurden Zahlen von 1 - 10 zugeordnet. Als Markierungsmaximum wurde die Markierungsstärke von Lysosomen zum Zeitpunkt 10 h angenommen. Ihr wurde der Wert $n = 10$ zugeordnet. Die Verteilung der Werte ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben (Tab. 9):

Zeitraum	Vesikel	Endosomen	MVB	Lysosomen
0 - 1'	8	2	0	0
1 - 5'	6	4	0	0
5 - 15'	4	5	1	1
15 - 30'	3	3	2	2
30 - 60'	1	3	2	4
1 - 5 h	1/2	1/2	2	7
5 - 10 h	0	0	0	10

Tabelle 9: Verteilung der intrazellulären Markierungsstärke zu verschiedenen Zeitpunkten

Anmerkung: Der Markierungsstärke zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde die Größe 10 zugeordnet. Es wurde für alle Zeitpunkte die gleiche Größe gewählt, obwohl sich die absoluten Markierungsstärken zu verschiedenen Zeitpunkten voneinander unterscheiden. Dieses wurde nicht berücksichtigt, weil hier in erster Linie die Verteilung der Markierungsstärke in den einzelnen Kompartimenten zu einem bestimmten Zeitpunkt interessiert. Die Verteilung wurde durch Schätzung ermittelt, indem jeweils 30 Momentaufnahmen von verschiedenen Zellen zu den Zeitpunkten 1, 5, 30 min und 1, 5, und 10 h ausgewertet wurden.

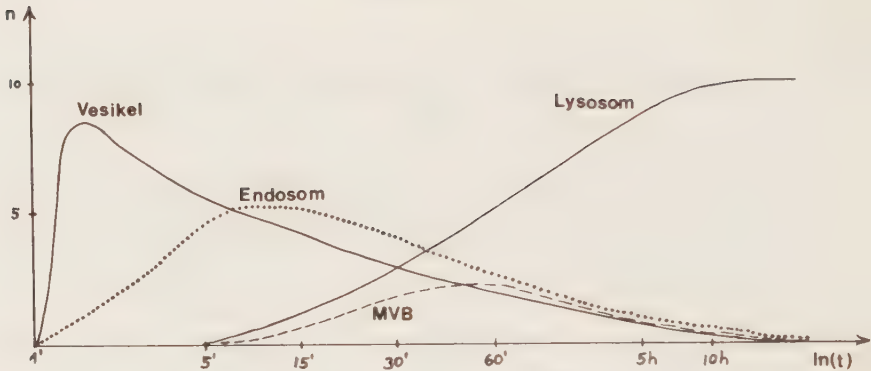


Abb. 7 Graphische Darstellung der Kinetik der Endocytose

Die Darstellung der Veränderung der Markierungsstärke innerhalb einzelner Kompartimente mit der Zeit beruht auf der in Tab.9 angegebenen Schätzung. Die funktionelle Zuordnung der Kompartimente zueinander ist daraus nicht direkt ersichtlich.

Es wird jedoch eine Verlagerung der Markierungsschwerpunkte zu verschiedenen Zeitpunkten deutlich.

Die graphische Darstellung gibt angenähert den zeitlichen Verlauf der Markierung in den an der Endocytose von WGA-markierter Glykocalyx beteiligten intrazellulären Kompartimente wieder:

In den ersten 30 Minuten der Endocytose verlagert sich der Schwerpunkt der intrazellulären Markierung von Endocytosevesikeln (nach 5 min) zu Endosomen (nach 5 - 10 min).

Die Markierung in Endosomen bleibt über 30 Minuten relativ konstant und fällt dann langsam ab. In derselben Zeit steigt die Markierung in Multivesikulären Körpern (MVB) an. Sie erreicht nach ungefähr 60 Minuten ein Maximum und fällt danach langsam ab.

Die Markierung in Lysosomen nimmt stetig zu und erreicht zwischen 5 und 10 Stunden ein Maximum.

Nach 10 Stunden liegt außer in Lysosomen in keinem anderen intrazellulären Kompartiment Markierung vor.

3.4.3 Morphologie der während der Endocytose von WGA-Gold und WGA-Ferritin markierten Kompartimente

a) Kompartimente der frühen Endocytosephase:

Beobachtungen nach Erwärmung der Follikel auf 37°C und nach 1 - 5' Endocytose (Abb.8).

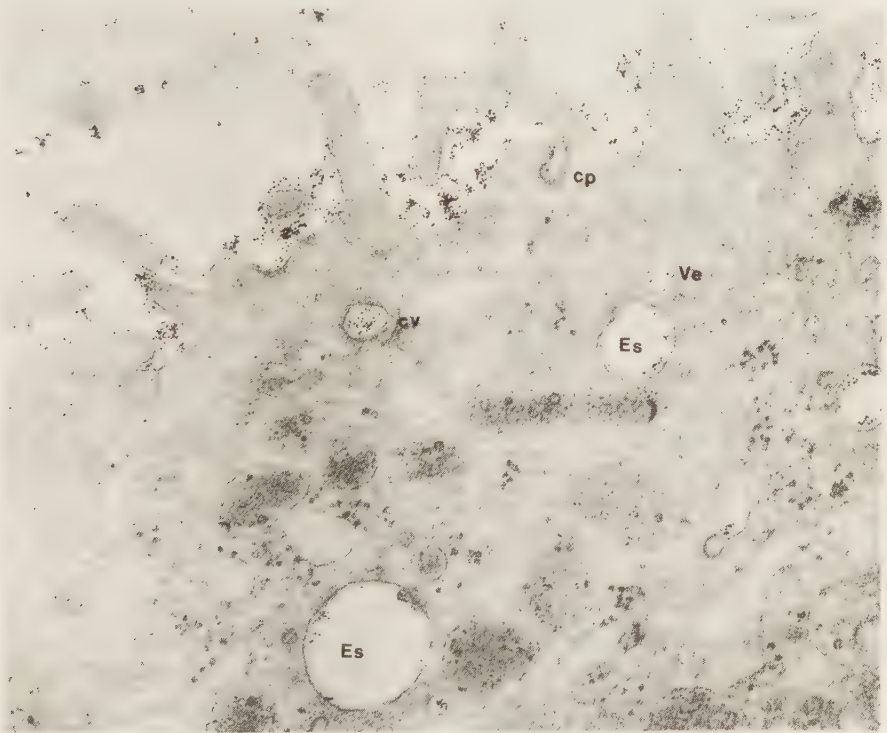


Abb. 8 Endocytose von WGA-Ferritin-markierter apikaler Plasmamembran (Frühe Phase). Darstellung eines apikalen Zellausschnitts nach 5 Minuten Endocytose. An der apikalen Plasmamembran (PM) bilden sich durch Invagination coated pits (cp) und coated vesicles (cv). Durch Verlust des Clathrin-coats entstehen aus coated vesicles Endocytose-Vesikel (Ve). Endocytisierte, markierte Membran wird zu Endosomen (Es) transportiert (Vgr. 64.000 x).

Unmittelbar nach Erwärmen der Follikel-Suspension auf 37°C und TSH-Stimulation beobachtet man an der Basis von Mikrovilli dicht markierte, ins Cytoplasma invaginierte coated pits ($\emptyset$ 0,3 μ m). (Abb. 8; Abb. 9) Coated pits schnüren sich in die Zelle ab und bilden coated vesicles (Abb. 8 u. Abb. 10).

Nach wenigen Sekunden (ungefähr 30 - 60 s) verlieren coated vesicles ihren dem Cytoplasma zugewendeten Clathrin-Saum und werden zu glattwandigen Endocytose-vesikeln.

Nach 2 - 5 min Endocytose beobachtet man markierte Endocytosevesikel zunehmend in der Nähe von Endosomen (Abb. 11).

Endosomen der frühen Endocytosephase sind vorwiegend im apikalen Cytoplasma lokalisiert. Sie haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 1 μ m und haben auf Ultradünnschnitten meist runde bis ovaläre Querschnitte. Endosomen weisen bereits nach wenigen Minuten (2 - 5 min) eine Markierung auf. Die Markerpartikel (WGA-Ferritin oder WGA-Gold) sind an die Innenseite (d.h an die der Matrix zugewendeten Seite) der Endosomenmembran gebunden. Der Abstand zwischen Markerpartikel und Endosomenmembran entspricht dem Abstand zwischen Markerpartikel und apikaler Plasmamembran.

Die Anwesenheit von markierten Endocytosevesikeln in unmittelbarer Nähe von Endosomen (Abb. 11) deutet daraufhin, daß Markerpartikel den Endosomen über einen vesikulären Transport zugeführt werden, indem markierte Vesikel mit der Membran von Endosomen fusionieren. Die Dichte und Verteilung der Membranmarkierung von Endosomen ist unterschiedlich ausgeprägt.

Die Matrix von Endosomen erscheint elektronenmikroskopisch leer. Dieser morphologischen Beobachtung entsprechen cytochemische Befunde, die die Abwesenheit von saurer Phosphatase und anderen lysosomalen Hydrolasen in Endosomen dokumentieren (30, 52).

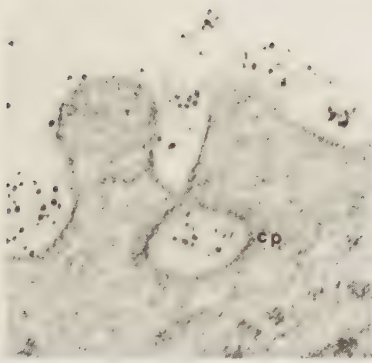


Abb. 9 Coated pit (cp) an der apikalen Plasmamembran nach 5 min Endocytose (Vgr.158.400x)

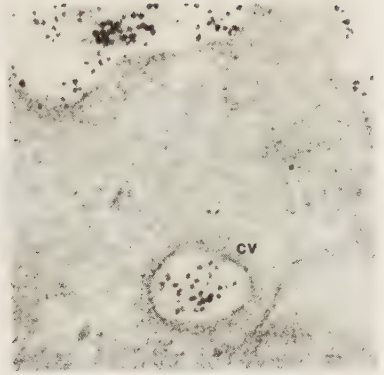


Abb. 10 Coated vesicle (cv) im apikalen Zytoplasma nach 5 min Endocytose (Vgr.144.000x)



Abb. 11 Markierte Endocytosevesikel (Ve) in der Nähe von Endosomen (Es) nach 5 min Endocytose (Vgr.66.000x)

b) Kompartimente der intermediären Endocytosephase

(nach 5 - 30 Minuten Endocytose markierte Kompartimente)

Während der ersten 15 Minuten einer Chase-Inkubation von markierten Follikeln nimmt die Anzahl und Markierungsdichte von Endocytosevesikeln und Endosomen im apikalen Bereich des Cytoplasmas stetig zu. Neben regelmäßig begrenzten Endosomen mit runden und ovalen Querschnitten treten nach 5 Minuten Endocytose zunehmend unregelmäßig begrenzte Endosomen auf. Sie tragen ein oder mehrere, vesikuläre oder tubuläre gegen das Cytoplasma gerichtete Membranausstülpungen (Abb. 12 a). Die Membranausstülpungen die einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,3-0,5 μm haben, sind unterschiedlich dicht markiert. Zu späteren Zeitpunkten (15 min) beobachtet man häufig Ausstülpungen mit dicht gepackter Markierung, während die restliche Endosomenmembran nur noch wenig markiert ist, (häufig in Form von Cluster-artigen Partikelansammlungen.)

Nach 5 Minuten Endocytose erreichen Markerpartikel erstmals Multivesikuläre Körper (MVB = multivesicular body) (Abb. 12 b) und Lysosomen (Abb. 12 c). Multivesiculäre Körper sind vorwiegend in tieferen Regionen des apikalen Cytoplasmas lokalisierte, vakuoläre Zellorganellen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2 - 3 μm . Sie besitzen häufig einige (1 - 3) vesikuläre oder tubuläre Membranausstülpungen gegen das Cytoplasma und enthalten in ihrer Matrix mehrere kleine Vesikel ($\emptyset$ 10 - 30 nm) eingeschlossen. Die Vesikel erscheinen morphologisch heterogen: einige sind elektronendicht andere leer. Die Mehrzahl der Vesikel trägt an die Außenseite ihrer Membran adsorbierte Markerpartikel (1 - 5 Partikel/Vesikel).

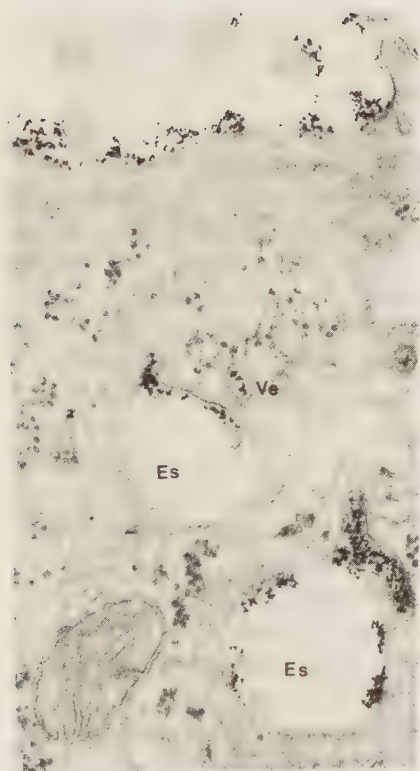


Abb. 12a

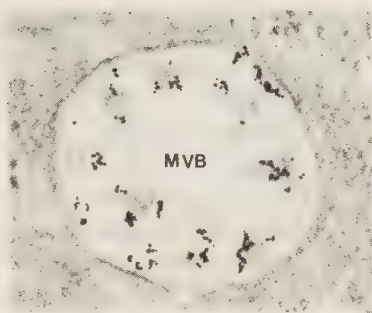


Abb. 12b

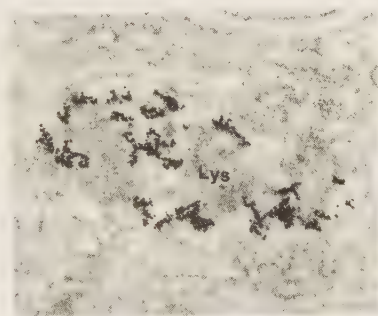


Abb. 12c

Abb. 12 Ausschnitte aus dem apikalen Cytoplasma von WGA-Gold-markierten Schilddrüsenfollikelzellen nach 15 Minuten Endocytose

- a) Endosomen (Es) mit tubulären Membranfortsätzen (Vgr.63.800x)
- b) Multivesikuläre Körper (MVB) (Vgr.91.800x)
- c) Lysosomen (Lys) (Vgr.88.200x)

Die die Multivesikulären Körper umschließende Membran ist an der Innenseite markiert; die Verteilung der Markerpartikel ist unregelmäßig. Sie ist in den meisten Fällen in Form von Clustern (= Anhäufungen von jeweils 10 - 15 Partikeln) angeordnet. Cytoplasmatische Membranextensionen von MVB sind oft dicht markiert. In der Nähe von MVB beobachtet man nach ungefähr 15 - 30 min dicht markierte vesikuläre und tubuläre Strukturen ($\emptyset$ 0,3 - 0,5 μ m). Sie entstehen wahrscheinlich durch Abschnürung von Membranausstülpungen der Endosomen oder Multivesikulären Körper.

An dieser Stelle sollte auf die Schwierigkeit hingewiesen werden, die sich ergibt, wenn man versucht anhand von zweidimensionalen Schnitten das räumliche Bild einer Zelle zu rekonstruieren: So ist es z.B. nicht möglich eindeutig zu entscheiden, ob es sich bei den in der Nähe von MVB gelegenen vesikulären und tubulären Strukturen um eigenständige Organellen handelt, oder ob sie mit Multivesikulären Körpern oder Endosomen verbunden sind.

Multivesikuläre Körper in Schilddrüsenfollikelzellen enthalten cytochemisch nachweisbar saure Phosphatase und werden deshalb als eine Form von Lysosomen betrachtet.

Lysosomen sind morphologisch durch eine elektronendichte Matrix charakterisiert. Cytochemisch können in der Matrix von Lysosomen saure Phosphatase und andere Hydrolasen nachgewiesen werden (46, 52).

In Lysosomen dissoziieren Markerpartikel von der Membran ab und akkumulieren in der Matrix. Die Verteilung der Markerpartikel innerhalb der Lysosomenmatrix weist zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Muster und Dichten auf:

- Nach 5 min Endocytose beobachtet man große, im apikalen Cytoplasma lokalisierte Lysosomen mit 1 - 2 kleinen Cluster-förmig angeordneten Ansammlungen von Markerpartikeln, meist in der Peripherie der Matrix.
- Nach 30 min Endocytose nimmt die Markierungsdichte innerhalb der Lysosomenmatrix zu. Markerpartikel liegen in Ansammlungen vor, die größere Bereiche der Matrix ausfüllen.

Innerhalb der Markeransammlungen kann man eine retikuläre Anordnung der Markerpartikel beobachten: die Partikel scheinen durch ein Netz aus dünnen, elektronendichten Filamenten miteinander Verbunden zu sein. Es handelt sich bei den Filamenten wahrscheinlich um lysosomal abgespaltene Zuckerketten der WGA-markierten, endocytierten Glykocalyx.

c) Kompartimente der späten Endocytosephase

(30 min - 10h)

Während die Zahl von markierten Vesikeln und Endosomen in den ersten 30 min der Endocytose zunimmt, bleibt sie in den folgenden 60 min relativ konstant und nimmt danach langsam wieder ab. Nach 3 - 5 h nimmt die Markierungsdichte der apikalen PM sichtbar ab: es treten zunehmend Membranabschnitte auf, die keine Markierung mehr tragen.

Nach 10 h ist die apikale Plasmamembran markerfrei die Markerpartikel sind in Lysosomen akkumuliert. Lysosomen haben auf Schnitten meist regelmäßig begrenzte, runde oder ovale Querschnitte mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2 - 4 μm (Abb. 13).

Die Lysosomen der späten Phase unterscheiden sich morphologisch von Lysosomen der frühen Phase:

Lysosomen der frühen Phase (vorwiegend in den ersten 30 min, vereinzelt auch zu späteren Zeitpunkten) sind im apikalen Cytoplasma lokalisiert. In ihrer wenig dichten Matrix liegen Markerpartikel in kleinen Ansammlungen verteilt vor (Abb. 13 a)

Lysosomen der späten Phase (60 min) haben eine elektronendichte Matrix und sind im basalm Cytoplasma lokalisiert. Mit zunehmender Endocytosedauer nehmen die Anzahl markierter Lysosomen und die Dichte ihrer Markierung zu.

Nach 1 - 3 Stunden beobachtet man bei der Mehrzahl der markierten Lysosomen eine flächenhafte, große Teile der Matrix ausfüllende Markierung (Abb. 13 b).

Nach 5 - 10 Stunden tragen die meisten Gold-markierten Lysosomen eine annuläre, wallartige Markierung in der Peripherie der Matrix, während das Zentrum der Matrix markerfrei bleibt (Abb. 13 d).

Die Packungsdichte der Markerpartikel innerhalb der annulären Markeransammlung nimmt mit der Zeit zu (Vrgl. Abb. 13 c u. 13 d)

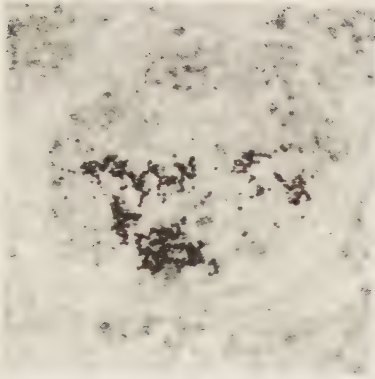


Abb. 13a

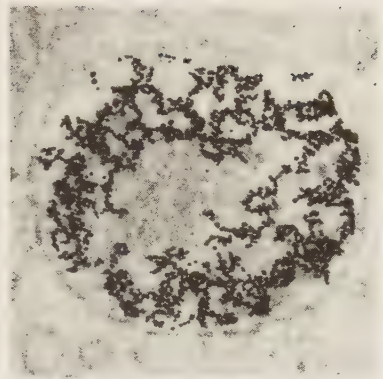


Abb. 13c



Abb. 13b



Abb. 13d

Abb. 13 Verteilung von 50 Å-Goldpartikeln innerhalb der Matrix von Lysosomen

- a) Nach 5 Minuten Endocytose sind Markerpartikel clusterförmig in der Matrix angeordnet (Vgr.107.800x)
- b) Mit zunehmender Endocytosedauer akkumulieren Markerpartikel in der Matrix von Lysosomen (Vgr.66.000x)
- c) Nach 30 Minuten Endocytose beobachtet man erstmals eine ringförmige Ansammlung von Markerpartikeln in der Peripherie von Lysosomen. Die Markerpartikel zeigen innerhalb der Ansammlung eine retikuläre Anordnung (Vgr.118.800x)
- d) Nach 3 - 10 Stunden Endocytose nimmt die Packungsdichte innerhalb der annulären Markeransammlung zu (Vgr.81.400x)

3.5 Sequentielle Doppelmarkierung mit WGA-Gold und cationisiertem Ferritin

3.5.1 Vormarkierung von inside-out Follikeln mit kolloidalem Gold

(Kolloidales Gold = 1. Marker)

Inside-out Follikel wurden bei 4°C mit WGA-Gold Konjugaten markiert (Methoden 2.2.3), gewaschen und danach 10 Stunden bei 37°C in markerfreiem Medium inkubiert.

Aus Vorversuchen (3.3) war bekannt, daß nach 10 Stunden Endocytose alle WGA-Gold markierten Membrankomponenten der apikalen Plasmamembran internalisiert werden. Die Markerpartikel akkumulieren in der Matrix von Sekundären Lysosomen (Abb. 13 b - d).

Nach 10 Stunden liegen inside-out Follikel vor, deren apikale Plasmamembran markerfrei ist und deren sekundäre Lysosomen mit kolloidalem Gold vormarkiert sind.

3.5.2 Endocytose von cationisiertem Ferritin

(Cationisiertes Ferritin = 2. Marker)

Mit kolloidalem Gold vormarkierte inside-out Follikel wurden bei 4°C in Medium mit cationisiertem Ferritin (10 µg/ml) resuspendiert und dann bei 37°C inkubiert. Nach 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten und nach 2, 5 und 10 Stunden wurden Proben entnommen und elektronenmikroskopisch ausgewertet.

Cationisiertes Ferritin ist ein unspezifischer Marker, der an die apikale Plasmamembran von Schilddrüsenfollikelzellen bindet, indem er mit anionischen Gruppen elektrostatische Wechselwirkungen eingeht (49).

Werden inside-out Follikel in der Kälte (4°C) mit cationisiertem Ferritin markiert, beobachtet man eine regelmäßige, dichte Verteilung der Markerpartikel an der apikalen Plasmamembran.

Bei Erwärmung auf 37°C findet eine Umverteilung der Markierung statt: cationisiertes Ferritin akkumuliert an der Basis von Microvilli.

Nach TSH-Stimulation wird cationisiertes Ferritin endocytisiert: coated pits (an der Basis von Microvilli) invaginieren und schnüren sich von der Membran ab. Sie bilden coated vesicles. Coated vesicles verlieren nach 30 - 60 s ihren Clathrin-coat und werden zu glattwandigen Endocytose-Vesikeln, die cationisiertes Ferritin zu Endosomen transportieren. In Endosomen ist cationisiertes Ferritin noch immer an die Innenseite der Membran gebunden. Nach 5 Minuten erreicht cationisiertes Ferritin Lysosomen. Die Markerpartikel dissoziieren von der Membran ab und akkumulieren in der Lysosomen-Matrix. Nach 30 Minuten beobachtet man cationisiertes Ferritin in lateralen Bereichen von Golgi Cisternen.

Ein kleiner Teil des endocytisierten cationisierten Ferritins wird transepithelial transportiert. Innerhalb von 11 Minuten (64) erreichen mit cationisiertem Ferritin markierte Vesikel die basolaterale Plasmamembran, wo cationisiertes Ferritin durch Exocytose freigesetzt wird. Die basale Plasmamembran wird nach 16 Minuten (46) erreicht.

Nach der Exocytose bleibt cationisiertes Ferritin an der Oberfläche der basolatenden oder basalen Plasmamembran adsorbiert, was darauf hindeutet, daß die anionischen Bindungsstellen mit cationisiertem Ferritin gemeinsam endocytisiert und transepithelial transportiert werden (52).

3.5.3 Endocytose von WGA-Gold und Endocytose von cationisiertem Ferritin Unterschiede und Gemeinsamkeiten

Die Endocytose von cationisiertem Ferritin unterscheidet sich in zwei wesentlichen Punkten von der Endocytose von WGA-Gold:

1. Cationisiertes Ferritin erreicht nach 30 Minuten Endocytose Golgi Cisternen. Eine Markierung mit WGA-Gold wird in Golgi Cisternen nicht beobachtet.
2. Cationisiertes Ferritin wird, membrangebunden, transepithelial transportiert. Eine Transcytose von WGA-Gold markierter Membran findet nicht statt.

Gemeinsam ist in beiden Fällen eine Markierung von Lysosomen nach 5 Minuten und eine zunehmende Akkumulation von Markerpartikeln in der Lysosomen-Matrix. Bei der Endocytose von cationisiertem Ferritin überwiegt der Transport zu Lysosomen quantitativ gegenüber dem Transport zu Golgi Cisternen und gegenüber der Transcytose. Im folgenden sind Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Endocytose von WGA-gold und der Endocytose von cationisiertem Ferritin tabellarisch zusammengefaßt (Tab. 10):

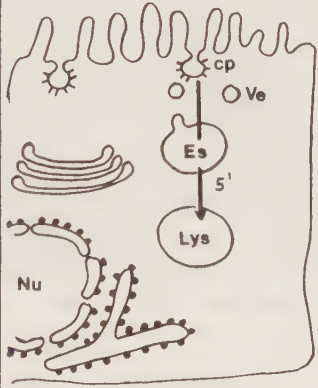
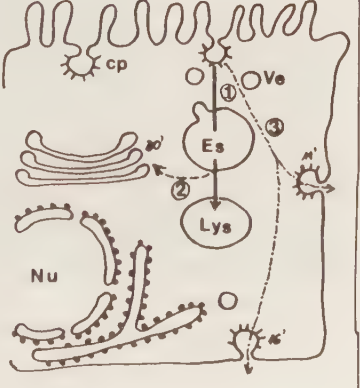
Gemeinsamkeiten	Kompartiment	WGA-Gold	Cationisiertes Ferritin
	Coated pit	+	+
	Coated vesicle	+	30 - 60 s
	Vesikel	+	1 - 2 min
	Endosom	+	2 - 5 min
	Lysosom	+	5 min
Unterschiede	Golgi Cisterne	Ø	+ (30 min)
	Transcytose	Ø	+ (11 bzw. 16 min)
	Endocytose-Route	1. Lysosomale Route	1. Lysosomale Route 2. Route zu Golgi Cisternen 3. Transcytose
	Schematische Darstellung (nach Herzog, 1984)		

Tabelle 10

3.5.4 Morphologie von sekundären Lysosomen bei sequentieller Doppelmarkierung von inside-out Follikeln

In den ersten 30 Minuten der Endocytose von cationisiertem Ferritin werden mit kolloidalem Gold vormarkierte Lysosomen vom zweiten Marker nicht (CF) nicht erreicht. Es liegen zwei verschiedene Lysosomenpopulationen (Abb. 14) vor:

1. eine ausschließlich mit kolloidalem Gold markierte ältere und
2. eine ausschließlich mit cationisiertem Ferritin markierte jüngere Population.

30 - 60 Minuten nach Endocytosebeginn beobachtet man CF erstmals in mit kolloidalem Gold vormarkierten Lysosomen:

Die CF-Partikel liegen meistens in Form von kleinen Clustern ($\approx 50 - 100$ Partikel) in der Peripherie der Matrix der mit Gold vormarkierten Lysosomen (Abb. 15a). Die Anzahl von "gemischt" markierten Lysosomen nimmt während der Endocytose von CF zu, bleibt aber insgesamt niedriger als die Anzahl von nur mit CF markierten Lysosomen.

Nach 2 - 5 Stunden Endocytose beobachtet man zunehmend gemischt markierte Lysosomen, bei denen cationisiertes Ferritin im Zentrum der Matrix liegt und von einem $0,2 - 0,3 \mu\text{m}$ breiten Wall aus Goldpartikeln umgeben wird. Nach 5 - 10 Stunden Endocytose treten unregelmäßig konfigurierte, längliche Lysosomen auf, in denen Markerpartikel nach Art des Markers (Gold oder CF) getrennt in verschiedenen Bereichen der Matrix liegen (Abb. 15b).

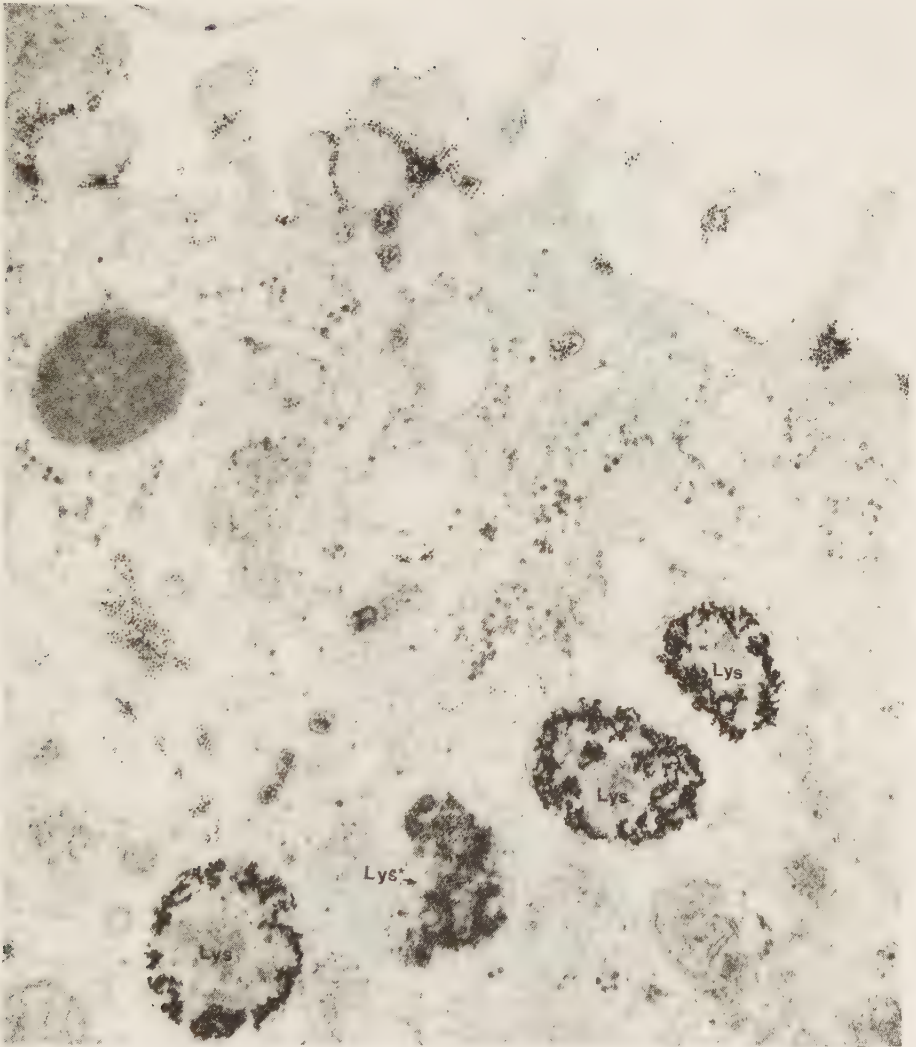


Abb. 14 Sequentielle Doppelmarkierung: 15 Minuten nach Endocytose von CF (2. Marker) liegen in Zellen, die vorher mit kolloidalem Gold (1. Marker) vormarkiert wurden, zwei getrennte Lysosomenpopulationen vor:

1. mit kolloidalem Gold markierte, ältere Lysosomen (Lys) und
2. mit cationisiertem Ferritin (CF) markierte, jüngere Lysosomen (Lys*)

Es gibt zu diesem Zeitpunkt keine gemischt markierten Lysosomen (Vgr.68.200x).

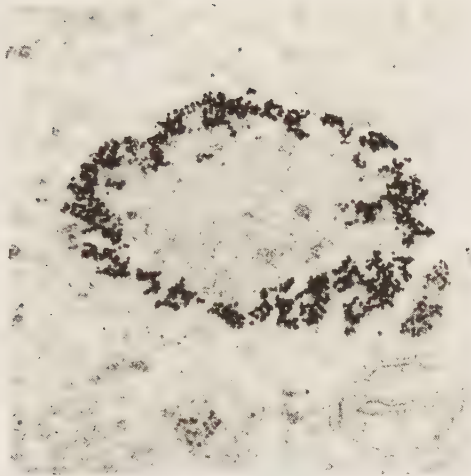


Abb. 15a

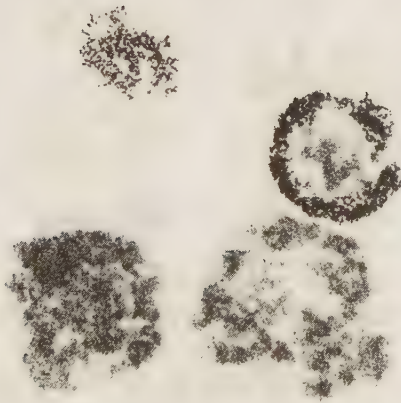


Abb. 15b

Abb. 15 Morphologie von sekundären Lysosomen bei sequentieller Doppelmarkierung mit kolloidalem Gold (1. Marker) und CF (2. Marker)

- a) Nach 30 Minuten tritt CF erstmals in mit kolloidalem Gold vormarkierten Lysosomen auf. Clusterförmige Anordnung von CF in der Peripherie (Vgr.110.000x).
- b) Nach 3-10 Stunden Endocytose von CF entstehen unregelmäßig konfigurierte, gemischt markierte Riesenlysosomen (Vgr.70.200x)

4. DISKUSSION

Experimentelles Ziel dieser Arbeit war die Darstellung und Charakterisierung von intrazellulären Kompartimenten, die sich an der Endocytose von glykosylierten Membrankomponenten beteiligen. Es wurde versucht, Aufschluß über Genese und Verhalten von sekundären Lysosomen in Schilddrüsenzellen zu erhalten. Im folgenden wird die Endocytose von WGA-markierter apikaler Plasmamembran diskutiert und mit der adsorptiven Endocytose von Thyreoglobulin verglichen.

4.1 Die lysosomale Route in inside-out Follikelzellen

4.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die physiologische Hauptroute der Endocytose folgt in Schilddrüsenfollikelzellen zu Lysosomen. Hier werden durch partielle Proteolyse von an der apikalen Plasmamembran endocytiertem Thyreoglobulin die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T_3) und Thyroxin (T_4) freigesetzt (123). Mit WGA markierte Glykocalyx folgt bei ihrer Endocytose ebenfalls der lysosomalen Route. Im folgenden sollen Aspekte der Aufnahme von WGA-markierten, glykosylierten Membrankomponenten diskutiert werden.

Bevor WGA-Ferritin oder WGA-Gold markierte Membrankomponenten Lysosomen erreichen, gibt es eine ungefähr 5 Minuten dauernde Phase, in der Markerpartikel ausschließlich an der Innenseite der Membran von elektronenmikroskopisch leer erscheinenden, vesikulären und tubulären Strukturen im apikalen Cytoplasma beobachtet werden.

Diese vesikulären und tubulären Strukturen werden als "prälysosomales Kompartiment" zusammengefaßt (44).

Hauptmerkmale von prälysosomalen Zellorganellen sind:

1. Abwesenheit von saurer Phosphatase und anderen lysosomalen Hydrolasen in der Matrix (21)
2. Adsorption von Markerpartikeln an die Innenseite, d.h. die der Matrix zugewandten Seite der Membran.

Zum prälysosomalen Kompartiment werden Endocytose-vesikel und Endosomen gerechnet. Um den prälysosomalen Charakter von Endosomen zu dokumentieren, wurden sequentielle Doppelmarkierungsversuche mit WGA-Gold und cationisiertem Ferritin durchgeführt. Diese Experimente geben zusätzlich Aufschluß über die Morphologie und das Verhalten von sekundären Lysosomen während einer länger dauernden, (10 Stunden) kontinuierlichen Aufnahme von Makromolekülen aus dem Extrazellulärraum. Es liegen morphologische Beobachtungen (siehe Ergebnisse) und morphometrische Untersuchungen (51) vor, die darauf hindeuten, daß in Schilddrüsenzellen Endosomen über Zwischenstufen in Lysosomen transformiert werden. Dieses als "Maturation Mechanismus" bezeichnete Konzept der Lysosomengenese steht einem von Helenius (45) propagierten "Vesicle Shuttle" Mechanismus des Membran-transportes zwischen Endosom und Lysosom gegenüber. Die beiden Konzepte werden im folgenden diskutiert.

4.1.2 Bindung von WGA an die apikale Plasmamembran und Endocytose

Das Konzept der adsorptiven Endocytose

Makromoleküle, die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion benötigt werden (endogene Liganden), werden über einen selektiven Transportmechanismus in den Intrazellulärraum transportiert. Sie werden an spezifische Bindungsstellen der Membran gebunden und endocytisiert.

Die Endocytose von membrangebundenen Liganden wird als adsorptive Endocytose bezeichnet. Sie ist Rezeptor-vermittelt, wenn folgende vier Kriterien gegeben sind (37):

1. Die Membranbindungsstelle ist ein Rezeptor im engeren Sinn: Darunter versteht man ein integrales Membranprotein, dessen Funktion darin besteht, endogene Liganden zu binden und dadurch eine physiologische Reaktion der Zelle zu veranlassen. Dieses Kriterium unterscheidet einen Rezeptor von anderen Membrankomponenten, die als Bindungsstellen für opportunistische Fremdmoleküle dienen. Beispiele dafür sind Bindungsstellen für Lektine, Toxine oder Viren.
2. Die Bindung des Liganden bewirkt eine sofortige Aufnahme (innerhalb von weniger als 10 Minuten) (76, 34, 13, 17, 5, 116)
3. Alle an Rezeptoren gebundenen Liganden werden über coated pits in die Zelle aufgenommen. Für die Konzentration von Rezeptoren in coated pits werden 2 Mechanismen diskutiert:

- a. Coated pits sind Mikrodomänen mit hoher Rezeptorenkonzentration
 - b. Die Bindung des Liganden induziert eine Diffusion von Rezeptoren zu coated pits. (2, 3, 80, 94, 70, 39)
4. Die endocytisierten Liganden werden in der Regel zu Lysosomen transportiert (37). Es gibt Ausnahmen bei denen Liganden zu anderen Kompartimenten transportiert werden (1).

Das erste der oben aufgeführten vier Kriterien ist das entscheidende, weil es den Unterschied zwischen Endocytose von endogenen Liganden (z.B. TG) und Endocytose von unphysiologischen, opportunistischen Liganden (z.B. CF oder Lektinen) hervorhebt.

Die restlichen drei Kriterien werden auch bei der Endocytose von einigen opportunistischen Liganden (wie z.B. Lektinen) erfüllt.

Die Endocytose von membrangebundenen Liganden (seien sie endogen oder opportunistisch) wird allgemein als adsorptive Endocytose bezeichnet und dem "fluid phase uptake", von nicht mit der Membran in Wechselwirkung tretenden Makromolekülen, gegenübergestellt. Die Rezeptor-vermittelte Endocytose ist eine spezifische Form der adsorptiven Endocytose.

Bindung von Thyreoglobulin und WGA an die apikale Plasmamembran

Aus Untersuchungen mit radioaktiv- oder Gold-markiertem Thyreoglobulin ist bekannt, daß TG an die apikale

Plasmamembran von Schilddrüsenfollikelzellen bindet (51). Der Bindungsmechanismus ist weitgehend unbekannt. Von Neumüller und Herzog (55, 75) wurde gezeigt, daß Thyreoglobulin phosphoryliert ist und unter anderem Mannose-6-Phosphat-Gruppen trägt. Es wird daher die Möglichkeit diskutiert, daß TG an einen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gebunden zu Lysosomen transportiert wird. Die Internalisierung von TG erfolgt also wahrscheinlich durch Rezeptor-vermittelte Endocytose. Die Glykocalyxmarker WGA-Ferritin und WGA-Gold werden nach ihrer Endocytose von der apikalen Plasmamembran ausschließlich zu Lysosomen transportiert. Sie imitieren damit die physiologische Hauptroute von TG. Membranrezeptoren die eine Endocytose von endogenen Liganden vermitteln, sind in der Regel glykosyliert (16).

Es ist denkbar, daß WGA unter anderem auch opportunistisch an Kohlenhydrat-Komponenten des Thyreoglobulin-Rezeptors bindet und deshalb die gleiche intrazelluläre Route markiert, wie der natürliche Ligand TG.

Um eine Beteiligung des zu WGA komplementären Zuckers (N-Acetyl-D-Glucosamin) an der Bindung von TG an den TG-Rezeptor nachzuweisen, könnte man versuchen, die TG-Bindung durch eine Überschußkonzentration von WGA kompetitiv zu hemmen. Würde sich die opportunistische Bindung von WGA an die TG-Bindungsstelle bestätigen, wäre das Lektin ein geeigneter, (wenn auch relativ unspezifischer) Marker für den TG-Rezeptor.

Bildung von Endocytose-Vesikeln an der apikalen Plasmamembran von inside-out-Follikelzellen

In inside-out Follikeln werden TG, CF und Gold- oder Ferritin markiertes WGA über coated pits in die Zelle aufgenommen. Bei Erwärmung der Follikel auf 37°C und nach TSH-Stimulation werden coated pits von der apikalen Plasmamembran abgeschnürt und bilden coated vesicles. Nach ungefähr 1 Minute verlieren coated vesicles ihre Clathrin-Hülle und bilden glattwandige Endocytose-Vesikel (46,47). Es ist wahrscheinlich, daß der TG-Rezeptor gemeinsam mit seinem Liganden TG in die Membran von Endocytose-Vesikeln aufgenommen und später zu Lysosomen transportiert wird. Morphologische Untersuchungen von Herzog (51) zeigen, daß Goldmarkiertes TG erst auf Ebene der Lysosomen von der Membran abdissoziiert. Die Existenz eines Rezeptors für TG impliziert nicht notwendigerweise, daß TG ausschließlich durch adsorptive Endocytose in die Zelle aufgenommen wird. In vivo liegt TG in sehr hohen Konzentrationen von durchschnittlich 110 mg/ml (109) im Follikellumen gespeichert vor. Es ist wahrscheinlich, daß TG in vivo (anders als in inside-out Follikeln) auch über "Fluid Phase Pinocytose" aufgenommen wird. Bei der "Fluid Phase Pinocytose" wird TG im Lumen von Endocytose-Vesikeln gelöst (d.h. nicht membrangebunden) zu anderen Zellkompartimenten transportiert. In inside-out Follikelzellen findet die Aufnahme von TG und anderen Membranliganden ausschließlich über adsorptive Endocytose statt. Die Endocytose-Vesikel transportieren Liganden, die an die Innenseite der Vesikelmembran adsorbiert sind.

4.1.3 Das prälysosomale Kompartiment

Morphologie und Genese von Endosomen

Endosomen sind ein prälysosomales Kompartiment, das von endocytisierten Liganden, je nach Zelltyp, 5 - 20 Minuten vor Lysosomen erreicht wird (67,44,45). Für das prälysosomale Kompartiment gibt es verschiedene synonyme Bezeichnungen:

- Endosom (16)
- Endocytotische Vakuole (3)
- Resorptive Vakuole (71)
- Phagosom (112)
- Pinosom (113)
- Sorting Vesikel (119) oder
- Receptosom (122,83,84).

Endosomen haben heterogene Erscheinungsformen: sie können rund, oval oder tubulär sein.

In Schilddrüsenzellen überwiegen runde bis ovale Endosomen, die gelegentlich (besonders in späten Phasen der Endocytose) cytoplasmatische Extensionen aufweisen. Endosomen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 1 μm und sind vorwiegend im apikalen Cytoplasma lokalisiert.

In der Nähe von Endosomen beobachtet man häufig eine größere Anzahl von markierten Endocytosevesikeln (Abb.11). Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß der Transport zwischen apikaler Plasmamembran und Endosomen über Vesikel erfolgt. Zur Endosomen-Genese sind zwei Mechanismen vorstellbar (45):

1. Endosomen sind permanente Zellorganellen, denen endocytisierte Membrankomponenten durch Verschmelzung mit Endocytosevesikeln zugeführt werden.
Später wird durch Abschnürung von Membran und Vesikel-Bildung endocytisiertes Material zu anderen Kompartimenten weitertransportiert (= "Vesicle Shuttle" Mechanismus).
2. Endosomen sind intermediäre, kurzlebige Organellen die durch Fusion von Endocytosevesikeln entstehen und später durch Verschmelzung mit primären Lysosomen über Zwischenstufen in sekundäre Lysosomen umgewandelt werden (= "Vesicle Maturation" Mechanismus).

In Endosomen von Schilddrüsenfollikelzellen bleibt die Bindung von endocytisierten Liganden (z.B. TG, CF, WGA-Gold und WGA-Ferritin) an die Innenseite der Membran erhalten. In anderen Zellsystemen (z.B. Fibroblasten) findet in Endosomen eine Aufhebung der Interaktion zwischen Ligand und Bindungsstelle statt (16). Für die Dissoziation von Ligand und Rezeptor wird ein niedriger pH-Wert im Lumen von Endosomen verantwortlich gemacht.

Der Nachweis, daß Endosomen einen sauren pH-Wert haben, stammt von Tycko und Maxfield (117). Schneider zeigte, daß ATP-abhängige Protonenpumpen für die Aufrechterhaltung eines sauren Milieus in Endosomen verantwortlich sind (96).

Beispiele für Liganden, die bei pH-Werten unter pH 6 von ihrem Rezeptor abdissoziieren, sind:

LDL (Fibroblasten) (3), Lysosomale Enzyme (Fibroblasten) (74,107), EGF (Fibroblasten, 3T3 Zellen) (17,39), Asialoglykoproteine (Hepatocyten) (5,116) und -₂Makroglobulin (Fibroblasten, Makrophagen) (70).

Die Dissoziation von Ligand und Rezeptor im Endosom ist in einigen Zellsystemen Voraussetzung dafür, daß Membranrezeptoren direkt von Endosomen zur Zelloberfläche zurücktransportiert werden können; d.h. es gibt ein Recycling der Rezeptoren auf Ebene der Endosomen. Es gibt eine Ausnahme, bei der Rezeptor und Ligand gemeinsam vom Endosom zur Zelloberfläche zurücktransportiert werden: es handelt sich um den Serum-Eisen-Carrier Transferrin. Die Interaktion zwischen Transferrin und Transferrin-Rezeptor ist säureunempfindlich (88). Transferrin wird an seinem Rezeptor gebunden, endocytisiert und zu Endosomen transportiert. In Endosomen wird durch den sauren pH-Wert das an Transferrin gebundene Eisen freigesetzt. Der Transferrin-Rezeptor Komplex wird zur Plasmamembran zurücktransportiert (20,42).

In Schilddrüsenfollikelzellen dissoziieren Liganden im Endosom nicht von der Membran ab. Dies läßt sich durch zwei mögliche Mechanismen erklären:

1. Endosomen in Schilddrüsenfollikelzellen haben kein saures Milieu
oder
2. die Bindung der bisher untersuchten Liganden (TG, CF und WGA) an die endocytisierte apikale Plasmamembran ist nicht säureempfindlich.

Das fehlende saure Milieu in Endosomen beziehungsweise die Unempfindlichkeit der Membranbindung der untersuchten Liganden gegenüber einem niedrigen pH-Wert führt dazu, daß in Schilddrüsenzellen endocytisierte Membranbindungsstellen zu Lysosomen transportiert werden. Ein hydrolytischer Abbau von Membranbindungsstellen wäre unökonomisch. Deshalb ist zu erwarten, daß es in Schilddrüsenzellen einen Recycling-Mechanismus auf Ebene der Lysosomen gibt. Experimentelle Hinweise dafür werden im Abschnitt 4.2 diskutiert.

Sequentielle Doppelmarkierung zur Demonstration des prälysosomalen Charakters von Endosomen

Es gibt folgende morphologische und kinetische Kriterien für den prälysosomalen Charakter von Endosomen in inside-out Follikeln:

1. Markierte Membrankomponenten erreichen bei ihrer Endocytose Endosomen früher als Lysosomen
2. Endosomen besitzen keine hydrolytischen Enzyme
3. Markerpartikel bleiben an die Innenseite der Endosomenmembran adsorbiert.

Sequentielle Doppelmarkierungsversuche ermöglichen eine morphologische Unterscheidung zwischen Endosomen und Lysosomen. Sie unterstützen somit die oben genannten drei Kriterien.

Inside-out Follikel wurden mit WGA-Gold markiert. Nach 10 Stunden Endocytose fand eine vollständige Aufnahme der markierten Membrankomponenten statt. Es lagen Follikelzellen vor, deren sekundäre Lysosomen mit kolloidalem Gold (= 1. Marker) vormarkiert waren. Die vormarkierten Follikel wurden in einem Medium mit cationisiertem Ferritin (= 2. Marker) bei 37°C inkubiert. Bei der Endocytose des zweiten Markers fand in den ersten fünf Minuten kein Transport von CF zu sekundären, mit kolloidalem Gold vormarkierten Lysosomen statt. Daraus folgt, daß in der frühen Phase der Endocytose von CF morphologisch eindeutig zwischen prälysosomalen, mit cationisiertem Ferritin markiertem und lysosomalen, mit kolloidalem Gold markiertem Kompartiment differenziert werden kann (Abb. 16).

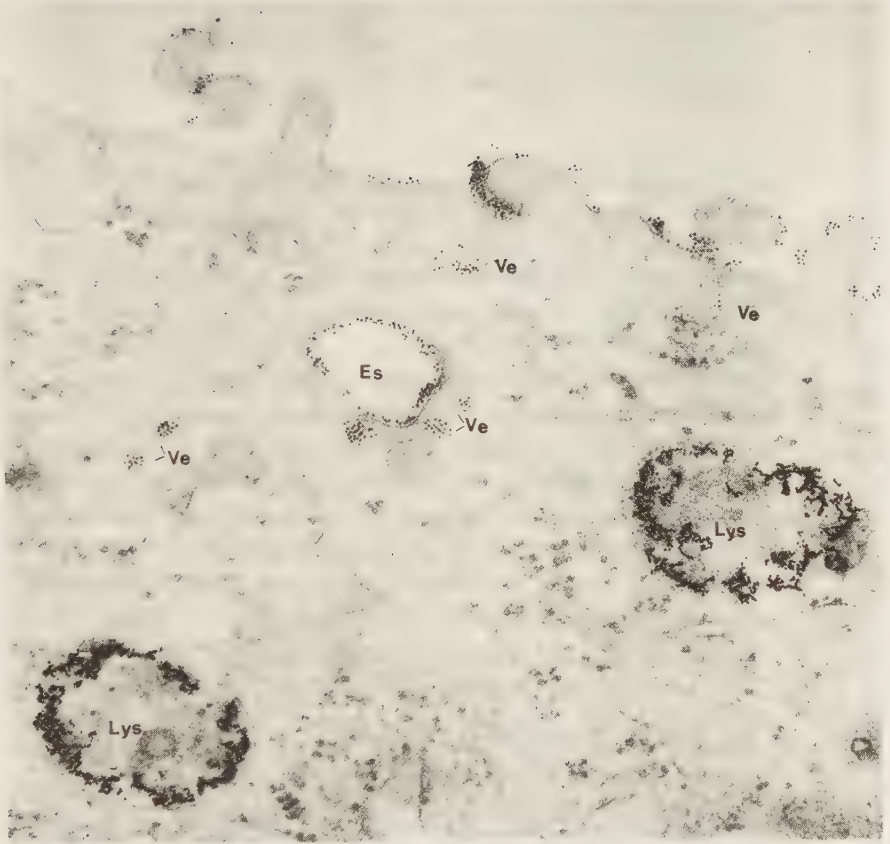


Abb. 16 Demonstration des prälysosomalen Charakters von Endosomen in sequentiellen Doppelmarkierungsversuchen. Nach 5 Minuten Endocytose von CF (2. Marker) beobachtet man Endocytosevesikel (Ve) und Endosomen (Es) in der Nähe der apikalen Plasmamembran (PM). Sekundäre, mit kolloidalem Gold (1. Marker) vormarkierte Lysosomen (Lys) werden in der frühen Phase der Endocytose von CF nicht erreicht (Vgr.65.100x).

Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, daß in den ersten fünf Minuten der Endocytose keine Fusionen zwischen mit CF markiertem, prälysosomalen Kompartiment und sekundären, goldmarkierten Lysosomen stattfinden.

4.1.4 Lysosomen

Genese von sekundären Lysosomen in vormarkierten Follikelzellen

Nach 5 Minuten Endocytose wurde CF erstmals in sekundären Lysosomen beobachtet: es handelt sich dabei um Lysosomen, die im apikalen Cytoplasma lokalisiert sind. Diese Lysosomen besitzen eine relativ helle Matrix, die keine Vormarkierung mit kolloidalem Gold aufweist. Nach fünf Minuten lassen sich in Gold-vormarkierten Zellen zwei verschiedene Formen von sekundären Lysosomen unterscheiden:

1. Mit kolloidalem Gold vormarkierte ältere Lysosomen, vorwiegend im basalen Cytoplasma und
2. mit cationisiertem Ferritin markierte jüngere, sekundäre Lysosomen, vorwiegend im apikalen Cytoplasma (siehe Ergebnisse Abb. 14).

Diese Beobachtung erlaubt folgende Interpretation: Innerhalb der ersten fünf Minuten Endocytose werden mit Gold vormarkierte Lysosomen von cationisiertem Ferritin nicht erreicht; danach gibt es keinen schnell funktionierenden Transportmechanismus zwischen apikaler Plasmamembran und sekundären vormarkierten Lysosomen.

Da alle sekundären Lysosomen vor Endocytose des zweiten Markers (CF) mit Gold vormarkiert sind, handelt es sich bei den nach fünf Minuten beobachteten CF-markierten Lysosomen um neu gebildete Zellorganellen. Sie entstehen wahrscheinlich durch direkte Umwandlung aus Endosomen.

Multivesikuläre Körper (MVB) stellen eine Übergangsform zwischen Endosom und Lysosom dar (56,41). In Multivesikulären Körpern von Schilddrüsenzellen (52) und von Epithelzellen des Ductus deferens (30) wurde cytochemisch saure Phosphatase-Aktivität nachgewiesen. Wolman und Mitarbeiter haben sich die Genese von Multivesikulären Körpern (MVB) durch Fusion von Endosomen mit primären Lysosomen vorgestellt (123,121). Zusätzlich kommt es durch Invagination der Membran und durch Abschnürung zur Bildung von kleinen Vesikeln, die in der Matrix von MVB liegen. Einige dieser Vesikel tragen an der Außenseite ihrer Membran Markerpartikel. Durch zunehmende Fusion von MVB mit primären Lysosomen kommt es zu einer Anhäufung von lysosomalen Enzymen in der Matrix; die Markerpartikel dissoziieren von der Membran ab oder werden durch saure Hydrolasen abgespalten. MVB werden so schrittweise zu sekundären Lysosomen. Dieser Prozeß wird als "Maturation Mechanismus" der Lysosomengenese bezeichnet (45). Unterstützt wird die Vorstellung des "Maturation Mechanismus" durch kinetische Daten: nach ungefähr 15 Minuten bleibt die Zahl von Endosomen trotz kontinuierlicher Endocytose von CF relativ konstant. Im selben Zeitraum nimmt die Zahl von Multivesikulären Körpern zu. Man kann die konstante Zahl von Endosomen über einen längeren Zeitraum als "steady state" zwischen Endosomen-Neubildung und Umwandlung in Multivesikuläre Körper auffassen.

Im Unterschied zu anderen Zellsystemen, wo endocytisierte Liganden bereits in Endosomen von ihrem Rezeptor abdissoziieren, bleibt die Bindung von Markerpartikeln an die Membran in Schilddrüsenzellen länger erhalten. Hier erfolgt erst im lysosomalen Kompartiment eine Akkumulation von Markerpartikeln in der Matrix. Die Lösung der Ligand-Membran Bindung wird durch pH-Änderungen oder durch hydrolytische Spaltung bewirkt.

Transport von CF zu sekundären, mit kolloidalem Gold vormarkierten Lysosomen

In Doppelmarkierungsexperimenten erreicht CF erst nach 30 Minuten mit kolloidalem Gold vormarkierte Lysosomen. Cationisiertes Ferritin liegt in Form von kleinen Clustern in der Peripherie der Matrix von Gold-markierten Lysosomen (Ergebnisse Abb. 15a). Diese Markerverteilung läßt an einen Mechanismus denken, bei dem sekundären, vormarkierten (also "alten") Lysosomen der zweite Marker über einen vesikulären Transport in Form von kleinen Portionen zugeführt wird.

Aus Untersuchungen zur Transcytose von Membranmarkern ist bekannt, daß der transzelluläre Transport von CF nur 16 Minuten benötigt. Die im Vergleich dazu kürzere Strecke zwischen apikaler PM und sekundären Lysosomen im basalen Cytoplasma müßte theoretisch in kürzerer Zeit überwunden werden.

Die Latenz von 30 Minuten bis zum Auftreten von doppelt (d.h. Gold- und CF-) markierten Lysosomen deutet darauf hin, daß ein direkter Transport von CF von der apikalen PM zu sekundären Lysosomen erst verzögert einsetzt oder, daß vormarkierte Lysosomen vom zweiten Marker nur indirekt erreicht werden. Diese zwei Möglichkeiten werden im folgenden diskutiert:

1. Verzögerter Transport

Es gibt regulatorische Mechanismen, die eine Neugene-
se von sekundären Lysosomen limitieren
(z.B. durch Hemmung der Synthese von lysosomalen
Enzymen).

In den ersten 30 Minuten der Endocytose von CF
entstehen neue Lysosomen über einen "Maturation
Mechanismus". Nach Erreichen einer bestimmten
Zahl von "jungen" Lysosomen wird die Genese
von sekundären Lysosomen verlangsamt. Es setzt
ein "Auffüllen" und eventuell eine Reaktivierung
(123) von "alten" sekundären Lysosomen im
basalen Cytoplasma über einen vesikulären
Transport von der apikalen Plasmamembran ein.

2. Indirekte Route zu sekundären Lysosomen

Es gibt einen indirekten vesikulären Transport
von Endosomen zu sekundären Lysosomen.

Nach ungefähr 15 Minuten beobachtet man Endosomen
mit dicht markierten cytoplasmatischen Exten-
sionen (Ergebnisse Abb. 12a), sowie dicht
markierte vesikuläre und tubuläre Strukturen in
direkter Umgebung von Endosomen und Lysosomen.

Vermutlich werden Extensionen ins Cytoplasma
abgeschnürt und fusionieren mit sekundären,
vormarkierten Lysosomen. Der indirekte Transport
über Endosomen zu Lysosomen setzt verzögert ein
(= "Vesicle Shuttle Mechanismus").

Die Beobachtung von Endosomen mit Cisternen
und das Auftreten von doppelt markierten Lyso-
somen zeigen zeitliche Koinzidenz.

Zusammenfassend lassen die Beobachtungen darauf
schließen, daß in Schilddrüsenfollikelzellen sowohl
"Maturation Mechanismus" als auch "Vesicle Shuttle Mecha-
nismus" bei der Genese von sekundären Lysosomen be-
teiligt sind:

In den ersten 30 - 60 Minuten überwiegt der "Maturation Mechanismus" quantitativ gegenüber dem "Vesicle Shuttle Mechanismus".

In späteren Phasen einer kontinuierlichen Endocytose kommt es durch vesikulären Transport von endocytisiertem Material zum Auffüllen von älteren sekundären Lysosomen und damit zur Zunahme ihrer Markierungsdichte.

Die oben diskutierten Vorstellungen sind in Abb. 17 schematisch zusammengefaßt.

Fusion von sekundären Lysosomen

Nach 5 - 10 Stunden Endocytose beobachtet man unregelmäßig konfigurierte, längliche Lysosomen, in denen Markerpartikel, nach Art des Markers (Gold oder CF) getrennt, in verschiedenen Bereichen der Matrix liegen (Ergebnisse Abb. 15b). Die Form der Lysosomen und die Verteilung der Markerpartikel läßt an eine Fusion von mehreren sekundären Lysosomen zu "Riesenlysosomen" denken.

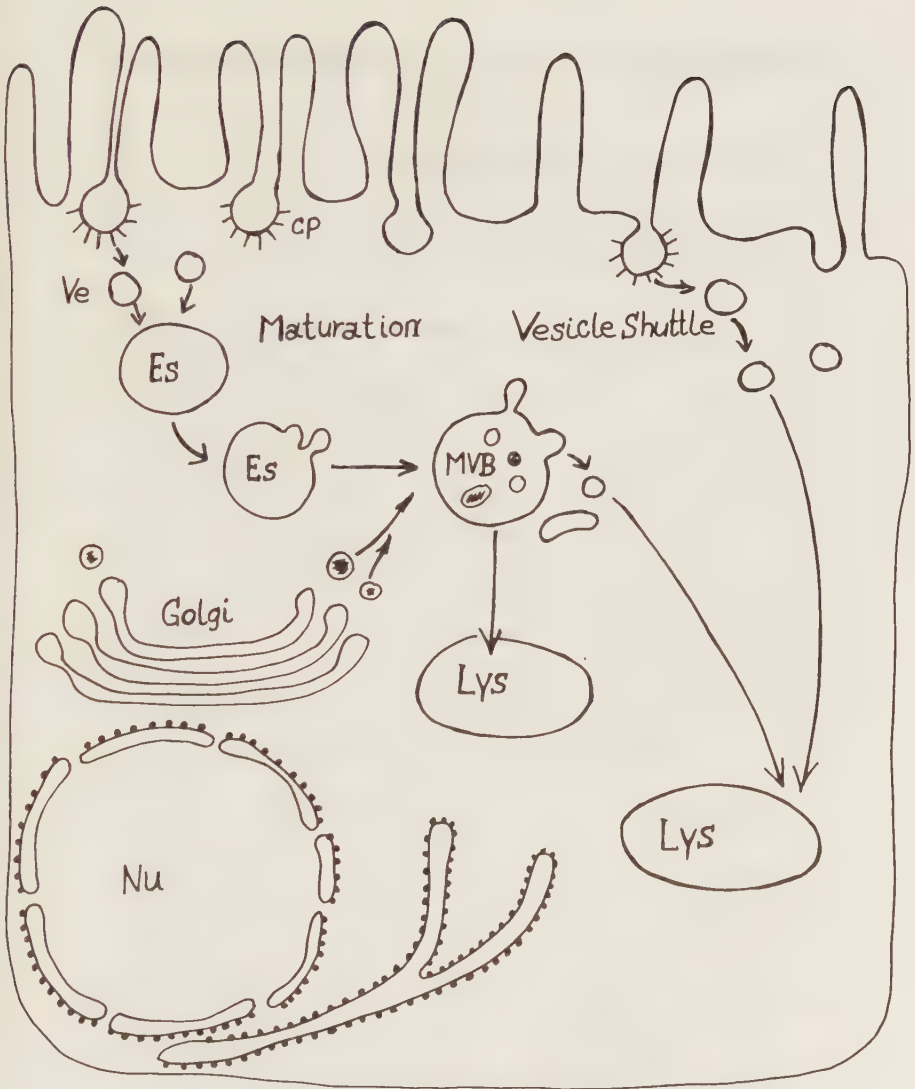


Abb. 17 Vesicle Shuttle Mechanismus und Maturation Mechanismus der Lysosomengenese in Schilddrüsenfollikelzellen

4.2 Membran-Recycling in Schilddrüsenfollikelzellen

4.2.1 Das Konzept des Membran-Recycling

Ein wichtiger Aspekt der Endocytose betrifft Mechanismen zu Aufrechterhaltung der polaren Organisation von Epithelzellen.

Die Follikelzellen zeigen charakteristische Unterschiede in Struktur und Aufbau von apikaler und basolateraler Zelloberfläche (Tab. 6). Morphometrische Untersuchungen haben gezeigt, daß in Schilddrüsenfollikelzellen pro Minute der Membranbetrag von ungefähr 1% der apikalen Zelloberfläche nach basolateral transportiert wird. Daraus folgt, daß in ungefähr 100 Minuten die gesamte apikale Zelloberfläche verschwunden sein müßte (53). Trotz kontinuierlicher Endocytose und Transcytose findet keine Reduktion der Membranoberfläche und auch keine Durchmischung von Membranbestandteilen statt.

Die Mechanismen, die es ermöglichen, daß Membrandomänen ihre Individualität beibehalten, sind weitgehend unbekannt. Es werden zwei Möglichkeiten diskutiert:

1. Die Endocytose ist ein selektiver Prozeß, bei dem bestimmte Membrankonstituenten in der Plasmamembran verbleiben (= "resident proteins"), während andere in die Zelle aufgenommen werden (= "migrant proteins") (16,11,12).
2. Bei der Endocytose werden alle Membrankonstituenten aufgenommen. Erst in einem intrazellulären Kompartiment findet eine Trennung statt, von Membrankonstituenten, die zur ursprünglichen Zelloberfläche zurücktransportiert werden (= Recycling) und anderen, die zu intrazellulären Membransystemen weiterwandern (45).

4.2.2 Membran-Recycling in Schilddrüsenfollikelzellen

Sequentielle Doppelmarkierungsversuche mit WGA-Gold und cationisiertem Ferritin in Schilddrüsenfollikelzellen (Ergebnisse 3.4) deuten darauf hin, daß in diesem Zellsystem möglicherweise Membran-Recycling auf der Ebene von Lysosomen stattfindet.

WGA-Gold wird während seiner Endocytose nie in Golgi Cisternen beobachtet. Es folgt ausschließlich der lysosomalen Route.

Cationisiertes Ferritin dagegen erscheint nach ungefähr 30 Minuten in kleinen Mengen in Trans-Cisternen des Golgi Apparates. Das verzögerte Auftreten von CF in Golgi Cisternen läßt an einen indirekten Transportweg denken: CF-markierte Membran wird zunächst (nach ungefähr 5 Minuten) zu Lysosomen transportiert. Ein Teil der Membran verläßt (wahrscheinlich hydrolytisch modifiziert) das Lysosom wieder und wird zu Golgi Cisternen transportiert. Ein kleiner Teil von cationisiertem Ferritin dissoziiert im Lysosom nicht von der Membran ab und markiert so indirekt den Weg der Membran zu Golgi Cisternen.

WGA-Gold oder WGA-Ferritin dagegen dissoziiert im Lysosom vollständig von der Membran ab. Die abdissoziierten Markerpartikel liegen in der Matrix von Lysosomen und sind durch ein Netz von elektronendichten Filamenten miteinander verbunden (Ergebnisse Abb. 13). Bei den elektronendichten Filamenten handelt es sich sehr wahrscheinlich um gemeinsam mit Markerpartikeln abgespaltene Kohlenhydratketten.

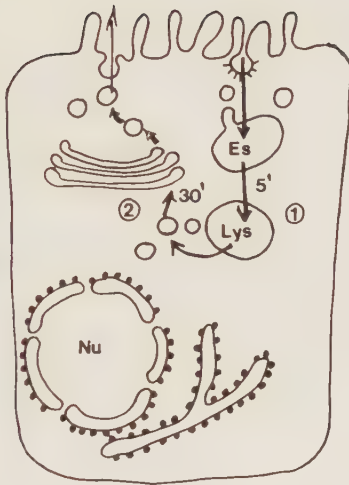
Die Glykocalyx von endocytierte apikaler Plasmamembran scheint durch lysosomale Glykosidasen zumindest teilweise abgespalten und abgebaut zu werden.

Es ist zu erwarten, daß deglykosylierte beziehungsweise partiell deglykosylierte (und damit Marker-freie) Membran zum Golgi Apparat, einem biosynthetisch aktiven Kompartiment transportiert wird. Hier erfolgt eine Modifikation beziehungsweise Rekonstitution von hydrolytisch veränderten Membrankomponenten, z.B. durch Re-Glykosylierung. Nach Rekonstitution ihrer ursprünglichen Struktur kann Membran wieder an ihren Ursprungsort, die apikale Plasmamembran, transportiert werden (= Recycling) (24,26,27). Die Vorstellung des Recycling von apikaler Plasmamembran wird durch folgende Beobachtung unterstützt:

Nach 5 - 10 Stunden kontinuierlicher Endocytose werden alle WGA-Gold markierten Membrankomponenten in die Zelle aufgenommen. Wird zu diesem Zeitpunkt eine zweite Glykocalyxmarkierung mit WGA-Gold durchgeführt, so resultiert eine gleichmäßige dichte Markierung der apikalen Plasmamembran (wie nach der ersten Markierung). Dieses Ergebnis spricht für eine Rekonstitution der WGA-Bindungsstellen an der apikalen Plasmamembran nach 10 Stunden. Die Rekonstitution kann nicht allein auf Neusynthese von glykosylierten Membrankomponenten beruhen, da die durchschnittliche Halbwertszeit von Glykolipiden und Glykoproteinen in einem Bereich von mehr als 10 Stunden liegt.

Es muß ein Recycling Mechanismus gefordert werden. Bei einem Recycling von glykosylierten Membrankomponenten scheint eine Beteiligung des Golgi Apparates (als glykosylierendes Kompartiment der Zelle) sehr wahrscheinlich.

Die oben diskutierten Vorstellungen eines Membran-Recycling unter Beteiligung des Golgi Apparates sind in Abb. 18 schematisch zusammengefaßt:



1. Lysosomale Route
2. Recycling Route
(über Golgi Cisternen)

Abb. 18 Membran-Recycling in Schilddrüsenfollikelzellen

Einschränkend muß erwähnt werden, daß es sich bei der von CF markierten Route zu Golgi Cisternen nicht notwendigerweise um einen indirekten Weg über Lysosomen handeln muß. Es könnte sich auch um einen direkten, langsamen Weg von cationisiertem Ferritin von der apikalen Plasmamembran zu Golgi Cisternen handeln. Um die Golgi Route eindeutig zu klären, wären kovalent an die Membran gebundene Marker erforderlich, die keine störenden Effekte auf die Zellfunktion ausüben. Diese "idealen" Marker wurden bisher noch nicht gefunden.

4.2.3 Membran-Recycling in anderen Zellsystemen (Makrophagen, Fibroblasten)

(Allgemeine Bedeutung des Membran-Recycling)

Das Konzept des Membran-Recycling hat allgemeine Gültigkeit. In endocytotisch aktiven Zellen ist Membran-Recycling eine absolute Notwendigkeit. Ohne Recycling würde die Zelloberfläche in kurzer Zeit erheblich reduziert werden (101,111,72) und Membranrezeptoren für physiologische Liganden wie z.B. LDL (37) oder Transferrin (57,58) wären innerhalb von Minuten aufgebraucht. Je nach Zellsystem unterscheiden sich die am Recycling-Prozeß beteiligten Kompartimente.

In Schilddrüsenfollikelzellen sind Lysosomen und Golgi Apparat wesentlich am Recycling von Membrankomponenten der apikalen Plasmamembran beteiligt.

In anderen Zellsystemen wie z.B. Makrophagen (112), Fibroblasten (37) oder Retikulocyten (115) wird den Endosomen eine Schlüsselrolle bei der Trennung von endocytisierten Membrankomponenten zugeschrieben.

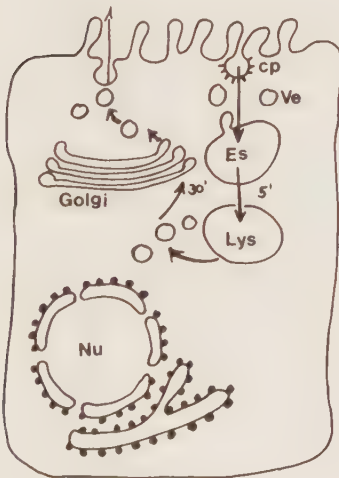
Im folgenden werden Ergebnisse einiger Autoren zitiert, die dafür sprechen, daß in den von ihnen untersuchten Zellsystemen Membran-Recycling im wesentlichen von Endosomen ausgeht:

- Der LDL-Rezeptor kehrt bereits 3 Minuten nach seiner Endocytose wieder an die Zelloberfläche zurück. Die Recyclingzeit ist kürzer als die Zeit, die für einen Transport zu Lysosomen benötigt wird. Dies spricht dafür, daß der Rezeptor direkt vom Endosom zur Zelloberfläche zurücktransportiert wird (97,4).
- Rezeptoren, die bei der Endocytose in Makrophagen beteiligt sind, haben eine relativ lange Halbwertszeit. Es ist unwahrscheinlich, daß sie während ihrer Endocytose lysosomalen Enzymen ausgesetzt werden (112).

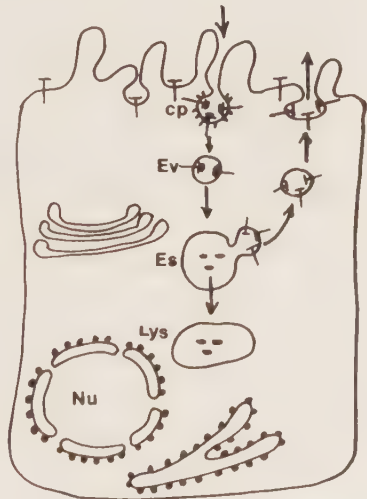
- Für Transferrin gibt es morphologisch beweisende Untersuchungen von Van Renswoude (88), die zeigen, daß Transferrin an seinen Rezeptor gebunden zu Endosomen transportiert wird. Nach der Abgabe von Eisen in Endosomen wird der Transferrin-Rezeptor-Komplex wieder zur Zelloberfläche transportiert, ohne Lysosomen zu erreichen.

Vergleich von Membran-Recycling in Schilddrüsenzellen mit Membran-Recycling in Fibroblasten

Die Vorstellung des Membran-Recycling auf Ebene der Endosomen (z.B. in Fibroblasten beim Recycling des LDL-Rezeptors) wird in der folgenden Darstellung (Abb. 19) dem Membran-Recycling auf Ebene der Lysosomen in Schilddrüsenfollikelzellen gegenübergestellt:



Schilddrüsenfollikelzelle
(nach Herzog 1984)



Fibroblast
(modif. nach Brown 1983)

Abb. 19

Recycling auf Ebene der Lysosomen unter Beteiligung des Golgi Apparates

Recycling auf Ebene der Endosomen
Im Endosom: Dissoziation von Ligand und Rezeptor

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Glykocalyx der apikalen Plasmamembran von Schilddrüsenfollikelzellen wurde selektiv mit WGA-Ferritin und WGA-Gold-Konjugaten markiert. Markierte Glykocalyx wird nach ihrer Endocytose über Vesikel, Endosomen und Multivesikuläre Körper zu Lysosomen transportiert. Ein Transport zu Golgi Cisternen oder ein transzellulärer Transport, wie er z.B. bei der adsorptiven Endocytose von cationisiertem Ferritin oder goldmarkiertem Thyreoglobulin beobachtet wird (52), findet bei der Endocytose von Lektin-markierter Glykocalyx nicht statt.

Da endocytisierte Glykocalyx ausschließlich der lysosomalen Route folgt, wird angenommen, daß Kohlenhydratkomponenten durch lysosomale Glykosidasen abgespalten und teilweise abgebaut werden. Die deglykosylierte und damit markerfreie Membran wird wahrscheinlich zum Golgi Apparat transportiert, wo eine Rekonstitution hydrolytisch veränderter Komponenten z.B. durch Reglykosylierung (24) erfolgt. In Schilddrüsenfollikelzellen gibt es ein Recycling von Membrankomponenten an dem Golgi Apparat und Lysosomen wesentlich beteiligt sind. Damit unterscheiden sich Schilddrüsenzellen von anderen endocytotisch aktiven Zellen wie z.B. Makrophagen (111) oder Fibroblasten (37), bei denen ein Recycling-Mechanismus auf Ebene der Endosomen nachgewiesen wurde .

Um Aufschluß über die Genese von Lysosomen zu erhalten, wurde die Endocytose von cationisierten Ferritin (CF) in mit kolloidalem Gold vormarkierten Schilddrüsen-

follikelzellen untersucht. Diese sequentiellen Doppelmarkierungsversuche erlauben in den ersten fünf Minuten der Endocytose des zweiten Markers (CF), eine morphologische Unterscheidung zwischen prälysosomalem mit cationisiertem Ferritin markiertem und lysosomalem mit kolloidalem Gold markiertem Kompartiment.

Innerhalb von fünf Minuten werden die zum prälysosomalen Kompartiment gehörenden Endosomen über Zwischenstufen (Multivesikuläre Körper) in sekundäre Lysosomen umgewandelt. Die schrittweise Umwandlung von Endosomen zu Lysosomen wird als "Maturation Mechanismus" bezeichnet. Er ist der in der Schilddrüsenzelle vorherrschende Mechanismus der Lysosomengenese. Der in anderen Zellsystemen beobachtete "Vesicle Shuttle Mechanismus" (45), der einen vesikulären Transport von endocytisiertem Material zu präformierten sekundären Lysosomen beschreibt, spielt bei der Lysosomengenese in Schilddrüsenfollikelzellen eine untergeordnete Rolle. In Schilddrüsenzellen setzt erst nach länger dauernden Endocytose (> 30 Minuten) ein "Auffüllen" und eventuell eine Reaktivierung (123) von älteren sekundären Lysosomen über einen vesikulären Transport ein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Abrahamson, D.R.; Rodewald, R. 1981. Evidence of the sorting of endocytic vesicle contents during thereceptor mediated transport of IgG across the newborn rat intestine. *J. Cell Biol.* 91, 270 - 280.
- 2 Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 1976. Localitation of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absense in 'cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 2434 - 2438.
- 3 Anderson, R.G.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. 1977. Role of the coated endocytic resicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell.* 10, 351 - 364.
- 4 Anderson, R.G.W., Brown, M.S., Beisiegel, U., and Goldstein, J.L., 1982. Surface distribution and recycling of the LDL receptor al visualized with anti-receptor antibodies. *J. Cell Biol.* 93, 523 - 532.
- 5 Ashwell, G., and Morell, A.G. 1974. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv. in Enzymology* Vol. 41, 99 - 128.
- 6 Avrameas S.; 1969. Coupling of enzymestoproteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry.* 6, 43.
- 7 Bayer, E.A.; Skutelsky, E.; Wynne, D.; Wilchek, M.; 1976. Preparation of Ferritin-Avidin Conjugates by reductive Alkylation for use in Electron Microscopic Cytochemistry. *J. Histochem. and Cytochem.* Vol 24, No 8, 933 - 939.
- 8 Bayer, E.A., et. al. 1976. Affinity cytochemistry: the localization of lectin and antibody receptors on erythrocytes ria the avidin-biotin complex. *FE BS letters*, 68, 240.

- 9 Bayer, E.A., Skutelsky, E. and Wilchek, M. 1979. The avidin-biotin complex in affinity cytochemistry. In: *Methods in Enzymology* 62, 308 - 315.
- 10 Bayer, E.A., Rivnay, B. and Skutelsky, E. 1979. On the mode of liposome cell interactions. Biotinconjugated lipids as ultrastructural probes. *Biochimica et Biophysica Acta* 550, 464 - 473.
- 11 Bretscher, M.S., Thomson, J.N. and Peavey B.M.F. 1980. Coated pits act as molecular filters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 77, No 7, 4156 - 5159.
- 12 Bretscher, M.S., 1983. Distribution of receptors for transferrin and low density lipoprotein on the surface of giant lte La cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol 80, 454 - 458.
- 13 Brown, M.S. and Goldstein, J.L. 1976. Analysis of a mutant Strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell* Vol 9, 663 - 674.
- 14 Brown, M.S., and Goldstein J.L. 1979. Receptor mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3330 - 3337.
- 15 Brown, M.S., Anderson, R.G.W., Basu, S.K., and Goldstein, J.L. 1982. Recycling of cell surface receptors: observations from the LDL receptor system. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 46, 713 - 721.
- 16 Brown, M.S., Anderson, R.G.W and Goldstein, J.L. 1983. Recycling receptors: the roundtrip itinerary of migrant membrane proteins. *Cell* 32, 663 - 667.
- 17 Carpenter, G. and Cohen, S. 1976. 125 J-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization and degradation in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* 71, 159 - 171.
- 18 Chaiet, L. and Wolf, F.J. 1964. The properties of Streptavidin, a biotin-binding protein produced by streptomycetes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 106, 1 - 5.
- 19 Danon, D., Goldstein, L., Marikovsky, Y. 1972. Use of cationized ferritin as a label of negative charges on cell surfaces. *J. Ultrastruct. Res.* 38, 500 - 510.

- 20 Dautry Varsat, A., Ciechanover, A. and Lodish, H.F. 1983. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89, 2258 - 2262.
- 21 Dunn, W.A., Hubbard, A.L. and Anderson, N.N. 1980. Low temperature selectively inhibits fusion between pinocytic vesicles and lysosomes during heterophagy of 125J-asialofetuin by the perfused rat liver. J. Biol. Chem. 255, 5971 - 5978.
- 22 Ekholm, R. and Wollman, S.H., 1975. Site of iodination in the rat thyroid gland detected from electron microscopic autoradiographs. Endocrinology 97, 1432 - 1444.
- 23 Ericson, L.E. and Engström, G., 1978. Quantitative electron microscopic studies on exocytosis and endocytosis in the thyroid follicle cell. Endocrinology 102, 883 - 892.
- 24 Farquar, M.G. 1978. Recovery of surface membrane in anterior pituitary cells. Variations in traffic detected with anionic and cationic ferritin. J. Cell Biol. 77, R 36 - R 42.
- 25 Farquar, M.G. 1981. Membrane recycling in secretory cells: implications for traffic of products and specialized membranes within the Golgi complex. Methods Cell Biol. 23, 299 - 427.
- 26 Farquar, M.G. 1982. Membrane recycling in secretory cells: pathways to the Golgi complex. Ciba Found. Symp. 92, 157 - 183.
- 27 Farquar, M.G. 1983. Multiple pathways of exocytosis, endocytosis and membrane recycling: validation of a Golgi route. Federation Proceedings Vol.42 Wo8.
- 28 Faulk, W.P. and Taylor, G.M. 1971. An immunocolloid method for the electron microscope. Immunochemistry 8, 1081.
- 29 Frens, G. 1972. Particle size and sol stability in metal colloids. Kolloid-Z u. Z-Polymere 250, 736.
- 30 Friend, D.S.; Farquar, M.G. 1967. Functions of coated vesicles during protein absorption in the rat vas deferens. J. Cell Biol. 35, 357 - 376.

- 31 Geoghegan, W.D. and Ackerman, G.A. 1977. Adsorption of horse radish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of Concanavalin A, wheat germ agglutinin and goat antihuman immunoglobulin G on all surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 1187 - 1200.
- 32 Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, J.A.M., Lodish, H.F. and Schwartz, A.L. 1983. Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* 32, 277 - 287.
- 33 Goldstein, J.J., Go, L.L. 1967. Protein-Carbohydrate Interaction. *J. Biol. Chem.* 242, 1617-1622.
- 34 Goldstein, J.L., Bosu, S.K., Brunschede, G.Y. and Brown, M.S. 1976. Release of low density lipoprotein from its cell surface receptor by sulfated glycosaminoglycans. *Cell* 7, 85 - 95.
- 35 Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 1977. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 897 - 930.
- 36 Goldstein, J.L., Buja, L.M., Anderson, R.G.W. and Brown, M.S. 1978. In *Protein Turnover and Lysosome function* (eds. Segal, H.L. and Doyle, D.F.). 455 - 477. Academic, N.Y.
- 37 Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., Brown, M.S. 1979. Coated pits, coated vesicles and receptor-mediated endocytosis. *Nature (London)* 279, 679 - 685.
- 38 Gonatas N., IC. and Avrameas S., 1973. Detection of Plasma Membrane Carbohydrates with Lectin Peroxidase Conjugates. *The Journal of Cell Biology*, 59, 436 - 443.
- 39 Gorden, P., Carpentier, J.L., Cohen, S. and Orci, L. 1978. Epidermal growth factor: morphological demonstration of binding, internalization and lysosomal association in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 75, No.10, 5025-5029.
- 40 György, P., Rose, C.S. and Tomarelli, R. 1942. Avidin. *J. Biol. Chem.* 144, 169.

- 41 Haigler, H.T., Mc Kanna, J.A. and Cohen, S. 1979. Rapid stimulation of pinocytosis in human carcinoma cells A 431 by epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 83, 82 - 90.
- 42 Harding, C., Heuser, J. and Stahl, P. 1983. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and Recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* Vol.97, 329 - 339.
- 43 Harrison, P.M. 1959. The structures of ferritin and apoferritin: some preliminary X-ray data. *J. Mol. Biol.* 1, 69 - 80.
- 44 Helenius, A., Marsh, M. and White, J. 1980. The entry of viruses into animal cells. *Trends in Biochemical Sciences* 5, 104 - 106.
- 45 Helenius, A., Mellman, J., Wall, D. and Hubbard, A. 1983. Endosomes. *Trends in Biol. Sci. (TiBS)*, July 1983, 245 - 250.
- 46 Herzog, V. and Miller, F. 1979. Membrane retrieval in epithelial cells of isolated thyroid follicles. *Eur. J. Cell Biol.* 19, 203 - 215.
- 47 Herzog, V. 1981. Pathways of endocytosis in secretory cells. *Trends in Biochemical Sciences* 6, 319 - 322.
- 48 Herzog, V. and Miller, F. 1981. Structural and functional polarity of inside-out follicles prepared from pig thyroid gland. *Eur. J. Cell Biol.* 24, 74 - 84.
- 49 Herzog, V. and Farquar, M.G. 1983. Use of tracers for studies on endocytosis and membrane recycling. In *Biomembranes: Membrane Biogenesis, Assembly and Recycling. Methods in Enzymology*, Vol.98, 203 - 225. (S. Fleischer and B. Fleischer eds., Academic Press, N.Y.)
- 50 Herzog, V. 1983. Preparation of inside-out thyroid follicles for studies on transcellular transport. In *Biomembranes: Membrane Biogenesis, Assembly and Recycling. Methods in Enzymology*, Vol.98, 447 - 458. (S. Fleischer and B. Fleischer eds., Academic Press, N.Y.)
- 51 Herzog, V. 1983. Transcytosis in Thyroid Follicle Cells. *J. Cell Biol.* Vol.97, 607 - 617.

- 52 Herzog, V. 1984. Pathways of endocytosis in thyroid follicle cells. In "International Review of Cytology", Vol.91, 107 - 139.
- 53 Herzog, V. 1985. Vesicular transport of thyroglobulin across the follicular wall. In: Thyroglobulin - The Bothyroid Hormone (Progress in Endocrine Research and Therapy, Vol.2), M.C. Eggo and G.N. Burrow, eds., Raven Press, New York, 1985, 143 - 151.
- 54 Herzog, V. 1985. Secretion of sulfated thyroglobulin. Eur. J. Cell Biol. Vol.39, 399 - 409.
- 55 Herzog, V. 1985. Secretion of sulfated and phosphorylated thyroglobulin in vivo and in vitro. Incorporation of ^{35}S - into thyroglobulin. Eur. J. Cell Biol. Suppl.⁴⁷ (Vol.36), 27.
- 56 Holtzman, E. 1976. Cell Biol. Monogr. 3, 1 - 27.
- 57 Hopkins, C.R. 1983. Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A 431 cells. Cell, Vol.35, 321 - 330.
- 58 Hopkins, C.R. and Trowbridge, J.S. 1983. Internalization and processing of transferrin and transferrin receptor in human carcinoma A 431 cells. J. Cell Biol. 97, 508 - 521.
- 59 Horrisberger, M., Rosset, J., Bauer, H. 1975. Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in the scanning electron microscope. Experientia 31, 1174.
- 60 Horrisberger, M., Rosset, J. 1976. Localization of wheat germ agglutinin receptor sites on yeast cells by scanning electron microscopy. Experientia 32, 998.
- 61 Horrisberger, M., Rosset, J. 1977. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. J. Histochem and Cytochem Vol.25, No.4, 295 - 305.
- 62 Horrisberger, M. 1979. Evaluation of colloidal gold as a cytochemical marker for transmission and scanning electron microscopy. Biol. Cell 36, 253 - 258.

- 63 Horsépián, S., Ferraci, H., Bernadec, A., Tayet, G. and Maroux, S. 1982. Aminopeptidase N is a marker for the apical pole of porcine thyroid epithelial cells in vivo and in culture. *Cell Tissue Res.* 1981, 221 (1), 137 - 146.
- 64 Jirgensons, B. and Straumans, M.E. 1964. A short text of colloid chemistry. 2nd ed. Pergamon Press, London.
- 65 Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137a.
- 66 Kehle, Th. and Herzog, V. 1985. A photometric assay for the binding of gold conjugates on cell surfaces. *Eur. J. Cell Biol. Suppl.* 7 (Vol.36), 32.
- 67 Korn, E.D. 1975. Biochemistry of endocytosis. In *MTP International Review of Science*, 2, C.F. Fox, ed. (London: Butlerworths), 1 - 26
- 68 Lissitzky, S. 1976. Biosynthesis of thyroid hormones. *Pharmacol. Ther. B* 2 (1), 219 - 246.
- 69 Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 409 - 414.
- 70 Maxfield, F.R., Willingham, P.J.A., Pastan, J. 1979. Aminos inhibit the clustering of γ -macroglobulin and EGF and the fibroblast cell surface. *Nature* Vol.277, 661 - 663.
- 71 Miller, F. and Palade, G.E. 1964. Lytic activities in renal protein absorption droplets. *J. Cell Biol.* 79, 519 - 552.
- 72 Muller, W.A., Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. 1980. The membrane proteins of the vacuolar system. Analysis by a novel method of intralysosomal iodination. *J. Cell Biol.* 86, 292 - 303.
- 73 Nadler, N.J., Sarkar, S.K. and Leblond, C.P. 1962. Origin of intracellular colloid droplets in rat thyroid. *Endocrinology* 71, 120 - 129.
- 74 Neufeld, E.F., Sando, G.N., Garvin, A.J. 1977. The transport of lysosomal enzymes. *J. Supramol. Struct.* 6 (1), 95 - 101.

- 75 Neumüller, W. and Herzog, V. 1985. Secretion of sulfated and phosphorylated thyroglobulin in vivo and in vitro. Phosphorylation of thyroglobulin. Eur. J. Cell Biol. Suppl.7 (Vol.36), 47.
- 76 Neville, D.M. and Chong, T.M. 1978. Receptor-mediated protein transport into cells. Entry mechanism for toxins, hormones, antibodies, viruses, lysosomal hydrolase, asialo-glycoproteins and carrier proteins. Curr. Top. Membr. Transp. 10, 65 - 150.
- 77 Nicolson, G.L., Singer, S.J. 1971. Ferritin conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy: Application to saccharide bound to all membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68, 942 - 945.
- 78 Nicolson, G.L. 1974. The interactions of lectins with animal cell surfaces. Int. Rev. Cytol. 39, 7.
- 79 Nicolson, G.L., Singer, S.J. 1974. The distribution and asymmetry of mammalian cell surface saccharides utilizing ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains. J. Cell Biol. 60, 236.
- 80 Orci, L., Carpenter, J.L., Perrelet, A., Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 1978. Occurrence of low density lipoprotein receptors within large pits on the surface of human fibroblasts as demonstrated by freeze etching. Exp. Cell Res. 113, 1 - 13.
- 81 Ottoson, P.D., Courtoy, P.J. and Farquar, M.G. 1980. Pathways followed by membrane recovered from the surface of plasma cells and myeloma cells. J. Exp. Med. 152, 1 - 19.
- 82 Maylié - Pfenninger, M.F. and Jamieson, J.D. 1979. Distribution of cell surface saccharides on pancreatic cells. I. General method for preparation and purification of lectin and lectin-ferritin conjugates. J. Cell Biol. 80, 69 - 76.
- 83 Pastan, J.H., Willingham, M.C. 1981. Journey to the center of the cell. Role of ceceptosome. Science 214, 504 - 509.
- 84 Pastan, J. and Willingham, M.C. 1983. Receptor-mediated endocytosis: coated pits, receptosomes and the Golgi. TiBS, July 1983, 250 - 254.

- 85 Pearse, B.M.F. 1976. Clathrin: an unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73, 1255 - 1259.
- 86 Pearse, B.M.F. 1978. On the structural and functional components of coated vesicles. *J. Mol. Biol.* 126, 803 - 812.
- 87 Poretz, R.D. and Goldstein, J.J. 1970. An examination of the topography of the saccharide binding sites of concanavalin A and of the forces involved in complexation. *Biochemistry* 9, 2890 - 2896.
- 88 Van Renswoude, J., Bridges, K.R., Harford, J.B. and Klausner, R.D. 1982. Receptor mediated endocytosis of transferrin and the uptake of Fe in K562 cells: identification of a nonlysosomal acidic compartment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79, 6186 - 6190.
- 89 Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17, 208 - 213.
- 90 Rice, S.G., Etzler, M.E. 1975. Chemical modification and hybridization of wheat germ agglutinin. *Biochemistry* 14, 4093.
- 91 Rodewald, R. and Abrahamson, D.R. 1980. Sorting of vesicle contents during IgG transport by the intestinal epithelium of the neonatal rat. *Eur. J. Cell Biol.* 22, 178.
- 92 Romano, E.L., Stolinski, C., Hughes-Jones, N.C. 1974. An antiglobulin reagent labelled with colloidal gold for use in electron microscopy. *Immunochemistry* 11, 521.
- 93 Romano, E.L., Romano, M. 1977. Staphylococcal protein A bound to colloidal gold: a useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunochemistry* 14, 711 - 715.
- 94 Roth, T.F., Cutting, J.A. and Atlas, S.B. 1976. Protein transport: a selective membrane mechanism. *J. Supramol. Struct.* 4, 527 - 548.
- 95 Roth, J., Bendayan, M., Orci, L. 1978. Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of Protein A-Gold Complex. *J. Histochem. and Cytochem.* Vol.26, No.12, 1074 - 1081.

- 96 Schneider, D.L. 1981. ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump. J. Biol. Chem. 256, 3858 - 3864.
- 97 Schwartz, A.L., Fridovich, S.E. and Lodish, H.F. 1982. Kinetics of internalization and Recycling of the Asialoglycoprotein Receptor in a Hepatoma Cell Line. J. Biol. Chem. Vol.257 No.8, 4230 - 4237.
- 98 Seefelder, C. 1983. Untersuchungen zur Zellproliferation von Schilddrüsenzellen in Momolayerkulturen und Suspensionen von inside-out Follikeln (Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München)
- 99 Sharon, N. and Lis, H. 1972. Lectins: Cell Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. Science Vol.177, No.4053, 949 - 959.
- 100 Sharon, N. 1977. Lectins. Scientific American, June 1977, 108 - 119.
- 101 Silverstein, S.C., Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. 1977. Endocytosis. Annu. Rev. Biochem. 46, 669 - 722.
- 102 Simionescu, N. Simionescu, M. and Palade, G.E. 1981. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. Preferential distribution of anionic sites. J. Cell. Biol. 90, 605 - 613.
- 103 Singer, S.J. 1959. Preparation of an Electron-dense Antibody Conjugate. Nature 183, 1523 - 1524.
- 104 Skutelsky, E. and Farquar, M.G. 1976. Variations in distribution of Con A receptor sites and anionic groups during red blood cell differentiation in the rat. J. Cell Biol. 71, 218 - 231.
- 105 Skutelsky, E. et al. 1979. The ultrastructural localization of cell surface glycoconjugates: Affinity cytochemistry via the avidin-biotin complex. Biol. Cell 36, No.3, 237.
- 106 Slot, J.W. and Geuze, H.J. 1981. Sizing of protein A colloidal gold probes for immunoelectron microscopy. J. Cell Biol. 90, 533 - 536.
- 107 Sly, W.S., Stahl, P. 1978. Receptor-mediated uptake of lysosomal enzymes. In: Silverstein, S.C., ed. Transport of macromolecules in cellular systems. Berlin Dahlem Konferenzen, 229 - 244.

- 108 Smeds, S. 1972. A microgel electrophoretic analysis of the colloid proteins in single rat thyroid follicles.
II. The protein concentration of the colloid in single rat thyroid follicles. *Endocrinology* 91, 1300 - 1306.
- 109 Smeds, S., Ekholm, R., Ericson, L.E. 1977. Protein concentration of the rat thyroid colloid during thyroxine treatment. *Acta Endocrinol.* 84 (4), 768 - 773.
- 110 Spiro, M.J. and Spiro, R.G. 1985. Effect of anion-specific inhibitors on the utilization of sugar nucleotides for N-linked carbohydrate unit assembly by thyroid endoplasmatic reticulum vesicles. *J. Biol. Chem.* 260 (9), 5808 - 5815.
- 111 Steinman, R.M., Silver, J.M., Cohn, Z.A. 1978. Recycling of membranes during endocytosis Silverstein, S.C. ed. *Transport of macromolecules in cellular systems*. Berlin Dahlem Konferenzen, 229 - 244.
- 112 Steinman, R.M., Mellman, J.S., Muller, A.W. and Cohn, Z.A. 1983. Endocytosis and the recycling of plasmamembrane. (Review) *J. Cell Biol.* 96, 1 - 27.
- 113 Straus, W. 1964. Occurrence of phagosomes and phago-lysosomes in different segments of the nephron in relation to the reabsorption, transport, digestion and extrusion of intravenously injected horseradish peroxidase. *J. Cell Biol.*, 295 - 308.
- 114 Straus, W. 1983. Mannose-specific bindingsites for horseradish peroxidase in various cells of the rat. *J. Histochem, Cytochem* 31, 78 - 84.
- 115 Sullivan, A.L., Grasso, J.A. and Weintraub, L.R. 1976. Micropinocytosis of transferrin by developing red cells: an electron-microscopic study utilizing ferritin conjugated antibodies to transferrin. *Blood* 47, 133 - 143.
- 116 Tolleshaug, H., Berg, T., Nilsson, M. and Novum, K.R. 1977. Uptake and degradation of 125J-labelled asialo-fetuin by isolated rat hepatocytes. *Biochemica et Biophysica Acta*, 499, 73 - 84.
- 117 Tycko, B., Maxfield, F.R. 1982. Rapid acidification of endocytic vesicles containing γ -macroglobulin. *Cell* 28, 643 - 651.

- 118 Visse, J. 1976. Adhesion of colloidal particles in surface and Colloid Science. Matjevic ed. Wiley and Sons, New York, 3 - 38.
- 119 Wall, D.A., Wilson, G. and Hubbard, A.L. 1980. The galactose-specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocytes. Cell 21, 79 - 93.
- 120 Weiser, H.B. 1949. A textbook of colloid chemistry. Wiley and Sons, New York, 1 - 44.
- 121 Wetzel, B.K., Spicer, S.S. and Wollman, S.H. 1965. Changes in fine structure and acid phosphatase localization in rat thyroid cells following thyrotropin administration. J. Cell Biol. 25, 593 - 618.
- 122 Willingham, M.C. and Pastan, J. 1980. The receptor-some: an intermediate organelle of receptor-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. Cell 21, 67 - 77.
- 123 Wollman, S.H., Spicer, S.S. and Burstone, M.S. 1964. Localization of esterase and acid phosphatase in granules and colloid droplets in rat thyroid gland. J. Cell Biol. 21, 191 - 201.
- 124 Wollman, S.H. 1969. Secretion of thyroid hormones. In: Lysosomes in Biology and Pathology. T. Dingle and H.B. Tell eds. Vol.2, 483 - 512. North Holland Publ. Amsterdam
- 125 Wollman, S.H. and Loewenstein, J.E. 1973. Rates of colloid choplet and apical vesicle production and Membrane Turnover during thyreoglobulin secretion and resorbtion. Endocrinology 93, 248 - 252.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 20. März 1959 als Tochter des Diplom-ingenieurs Kurt Chrestel und der Lehrerin Irmgard Chrestel in Kronstadt, Siebenbürgen (Rumänien) geboren.

Von 1966 bis 1970 besuchte ich die deutsche Grundschule in Kronstadt. 1971 trat ich ins "Johannes Honterus Lyzeum" in Kronstadt ein, wo ich bis Dezember 1973 die deutschsprachige Oberstufe besuchte.

Im Januar 1974 siedelte ich zusammen mit meinen Eltern aus politischen Gründen in die Bundesrepublik Deutschland um. Ab Januar 1974 besuchte ich das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Geretsried, wo ich 1979 das Abitur ablegte.

Von 1979 bis 1986 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München Medizin. Im Mai diesen Jahres schloß ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab.

Nach dem Physikum im August 1981 begann ich mit einer experimentellen Doktorarbeit im Labor von Prof.Dr. V.Herzog am Institut für Zellbiologie.

Während meiner Studienzeit erhielt ich ein Stipendium der Bayerischen Begabtenförderung und wurde nach dem ersten Semester im März 1980 in die Studienstiftung des Deutschen Volkes aufgenommen.

Die Arbeit ist in drei Teile gegliedert. Der erste Teil enthält eine allgemeine Einführung in die Lebensleistung, der zweite Teil eine Darstellung der Lebensleistung des Verstorbenen, der dritte Teil eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Der erste Teil ist in drei Abschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt enthält eine allgemeine Einführung in die Lebensleistung, der zweite Abschnitt eine Darstellung der Lebensleistung des Verstorbenen, der dritte Abschnitt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Der zweite Teil ist in drei Abschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt enthält eine allgemeine Einführung in die Lebensleistung, der zweite Abschnitt eine Darstellung der Lebensleistung des Verstorbenen, der dritte Abschnitt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Der dritte Teil ist in drei Abschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt enthält eine allgemeine Einführung in die Lebensleistung, der zweite Abschnitt eine Darstellung der Lebensleistung des Verstorbenen, der dritte Abschnitt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Der vierte Teil ist in drei Abschnitte gegliedert. Der erste Abschnitt enthält eine allgemeine Einführung in die Lebensleistung, der zweite Abschnitt eine Darstellung der Lebensleistung des Verstorbenen, der dritte Abschnitt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80